



不同基质刚度微囊对间充质干细胞 成骨分化的影响及体内评价*

刘思源^{1)**} 陆唐芳^{1)**} 吕永钢^{2)***} 陈国宝^{1)***}

(¹) 重庆理工大学药学与生物工程学院, 重庆 400054; (²) 武汉纺织大学纺织新材料与先进加工全国重点实验室, 武汉 430200)

摘要 **目的** 本研究旨在探究不同基质刚度微囊对间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 存活、增殖和成骨分化的调控作用, 并通过动物皮下埋植模型评价其在体组织学响应等。**方法** 本研究构建了具有不同基质刚度的碳纳米纤维 (carbon nanofiber, CNF)/海藻酸钠 (sodium alginate, SA) 三维微囊, 通过调节 CNF 含量制备 3 组刚度分别为 27.05、35.90 和 52.40 kPa 的微囊, 并对其形貌、力学性能、降解性能等理化性质进行表征。同时评价不同刚度微囊对 MSCs 存活、黏附及成骨分化的影响, 同时采用大鼠皮下埋植模型评价微囊的体内组织相容性, 并通过组织学及免疫组化分析其成骨相关蛋白质表达。**结果** 3 组微囊均具有规则均一的形貌、良好的可降解性, 除力学性能外其余理化性质无明显差异。Live/dead 染色显示, 各组微囊均具有良好的细胞相容性, 其中高刚度微囊更有利于 MSCs 黏附、生长及存活。碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性以及骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 和骨钙蛋白 (osteocalcin, OCN) 表达均随基质刚度增加而显著升高。免疫荧光结果进一步表明, 高刚度组 MSCs 中 Yes 相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP) 和整合素 $\beta 1$ (integrin $\beta 1$) 荧光信号呈增强趋势。体内实验显示, 所有微囊均具有良好的组织相容性, 高刚度组表现出更高的成骨相关蛋白 OPN 和 OCN 表达。**结论** CNF 赋予 SA 微囊可调控的基质刚度, 在保持良好生物相容性的同时, 高刚度微环境能够有效促进 MSCs 成骨分化, 为基于力学微环境调控的间充质干细胞递送及骨组织再生提供了一种具有应用潜力的三维细胞载体。

关键词 间充质干细胞, 微囊, 基质刚度, Yes 相关蛋白/具有 PDZ 结合基序的转录共激活因子, 骨修复

中图分类号 Q66, R318

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0384

CSTR: 32369.14.pibb.20260384

骨缺损是临床常见且具有挑战性的疾病, 自体骨和同种异体骨移植仍是主要治疗手段, 但供区损伤、术后疼痛、感染风险、供体来源有限及治疗成本较高等问题限制了其进一步应用^[1]。因此, 开发能够恢复、维持或改善骨组织功能的生物骨替代物, 成为骨组织工程的重要研究方向。间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 因具有自我更新、多向分化及低免疫原性等特点, 被认为是骨组织再生的重要种子细胞^[2]。MSCs 可来源于骨髓、脂肪和脐带等多种组织, 并可分化为成骨、成软骨和成脂等多种细胞类型^[3-4]。同时, MSCs 还能分泌基质衍生因子-1 (stromal derived factor-1, SDF-1)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和转化生长因子- β (transforming growth factor, TGF- β) 等多种生物

活性因子, 通过调控血管生成、免疫反应及组织重塑参与骨修复^[5]。研究表明, MSCs 的生物学行为高度依赖其所处微环境, 相较于传统二维培养, 三维微环境更能维持细胞表型和活性, 增强细胞间相互作用, 提高成骨分化潜能和组织修复能力^[6-7]。因此构建适宜的三维细胞微环境已成为调控 MSCs 向成骨方向分化, 并促进骨再生效果的重要策略。

细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 不

* 重庆市自然科学基金 (CSTB2025NSCQ-GPX0950) 和国家自然科学基金 (U23A2070) 资助。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

吕永钢 Tel: 027-59367809, E-mail: yglvbme@163.com

陈国宝 Tel: 023-62563190, E-mail: gbchen@cqut.edu.cn

收稿日期: 2026-07-15, 接受日期: 2026-09-08

仅为细胞提供结构支撑, 还通过生化和力学信号共同调控细胞黏附、迁移、增殖及谱系分化^[8]。其中, 基质刚度作为ECM的重要力学特征, 是决定MSCs命运的重要因素。不同刚度的基质可诱导MSCs产生不同的细胞骨架张力和黏附状态, 从而影响成脂、成肌及成骨分化^[9]。较软的基质更有利于脂肪分化, 而较高刚度则促进细胞铺展及骨相关基因和蛋白的表达, 增强成骨分化能力。细胞对基质刚度的感知依赖于机械传导过程^[9-10]。ECM中的力学刺激首先通过整合素(integrin)介导的黏着斑与细胞骨架建立连续的力学连接, 随后激活黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)等机械敏感分子, 并将外界机械信号转化为胞内生化信号, 进一步调控细胞骨架重塑及下游信号通路活性, 最终影响相关基因转录和细胞命运^[11]。基质刚度升高可增强整合素聚集和FAK磷酸化水平, 促进机械信号向细胞核传递, 从而调节MSCs的成骨分化过程^[12-13]。构建能够模拟天然ECM力学特性的生物材料, 精准调控细胞所处的力学微环境, 对于提高MSCs介导的骨组织再生效率具有重要意义。

海藻酸钠(sodium alginate, SA)是一种可生物降解和可再生的生物高聚物, 由 β -D-甘露糖醛(β -D-mannuronic, M)和 α -L-古洛糖醛酸(α -L-guluronic, G)组成, 可通过与二价阳离子(如 Ca^{2+})交联形成水凝胶^[14]。在一项工作中, 将人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells, hBMMSCs)包封在精氨酸甘氨酸天冬氨酸肽(arginine-glycine-aspartic acid, RGD)修饰的海藻酸微球中用于促进心肌修复。RGD修饰的海藻酸微球改善了细胞附着和生长, 并增加了血管生成生长因子的表达^[15]。然而, 由于有限的机械刚度和低韧性, 它们在生物医学应用中的应用受到严重阻碍^[16]。最近, 一维纳米材料, 如碳纳米纤维(carbon nanofiber, CNF)^[17]; 二维纳米材料, 如石墨烯、氧化石墨烯^[18]和合成硅酸盐纳米粒子^[19]已被纳入SA基水凝胶中, 以增强这些材料的刚度。其中, Ca^{2+} 能够通过双交联机制同时交联SA和CNF, 这有利于构建刚度更高的SA基材料^[20]。Llorens-Gómez等^[21]将2% (质量百分比) CNF加入海藻酸盐基质后, 藻酸钙膜在干燥状态下的拉伸模量和压缩模量分别增加了3倍和6倍。近年来, 基于天然高分子及复合材料构建的可调控力学微环境已被广泛用于调节MSCs行为。研究表明, 基质刚度可通过影响细胞机械感知

及信号转导过程调控MSCs成骨分化, 其中整合素介导的力学传递和下游信号通路在这一过程中发挥重要作用^[22]。然而, 现有研究多集中于二维基底或简单水凝胶体系, 对于三维细胞微环境中如何在保持材料结构稳定性和细胞相容性的同时实现刚度精准调控, 以及不同刚度环境对MSCs成骨行为影响的机制仍需进一步研究^[23]。因此, 构建具有可调控基质刚度的三维微囊体系, 对于深入理解力学微环境调控细胞命运及开发细胞递送材料具有重要意义。本研究通过调整CNF和SA的质量比, 制备不同刚度的CNF/SA水凝胶微囊(图1), 探究不同基质刚度微囊对MSCs黏附、存活和成骨分化的影响, 并结合大鼠皮下植入模型对其组织相容性及成骨相关指标进行初步验证, 为后续正位骨缺损模型中的骨修复研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本研究用于提取原代MSCs的Sprague-Dawley (SD) 大鼠均采购于重庆恩斯维尔实验动物有限公司, 体重为 (110 ± 20) g, 雄性。本研究用于皮下埋植实验的SD大鼠均购自恩斯维尔实验动物有限公司, 体重为 (200 ± 20) g, 均为雄性。所有实验动物相关操作均经重庆理工大学动物伦理委员会审核批准((2025)研审第(04)号)。

1.1.2 试剂与耗材

CNF、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性检测试剂盒、二乙酸荧光素(fluorescein diacetate, FDA)和碘化丙啉(propidium iodide, PI)购自北京索莱宝科技有限公司; SA购自阿拉丁试剂; Alexa Fluor 488标记山羊抗兔IgG(H+L)二抗购自上海碧云天生物技术有限公司; Masson三色染色试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 兔抗骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)抗体和兔抗骨桥蛋白(osteopontin, OPN)抗体购自成都正能生物技术有限公司; 二步法免疫组织化学检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。小鼠抗integrin $\beta 1$ 单克隆抗体购自美国Santa Cruz Biotechnology。

1.2 方法

1.2.1 CNF的表面羧基化

CNF经酸化处理以提高其亲水性和水分散性。将300 mg CNF加入200 ml体积比为3:1的浓硫

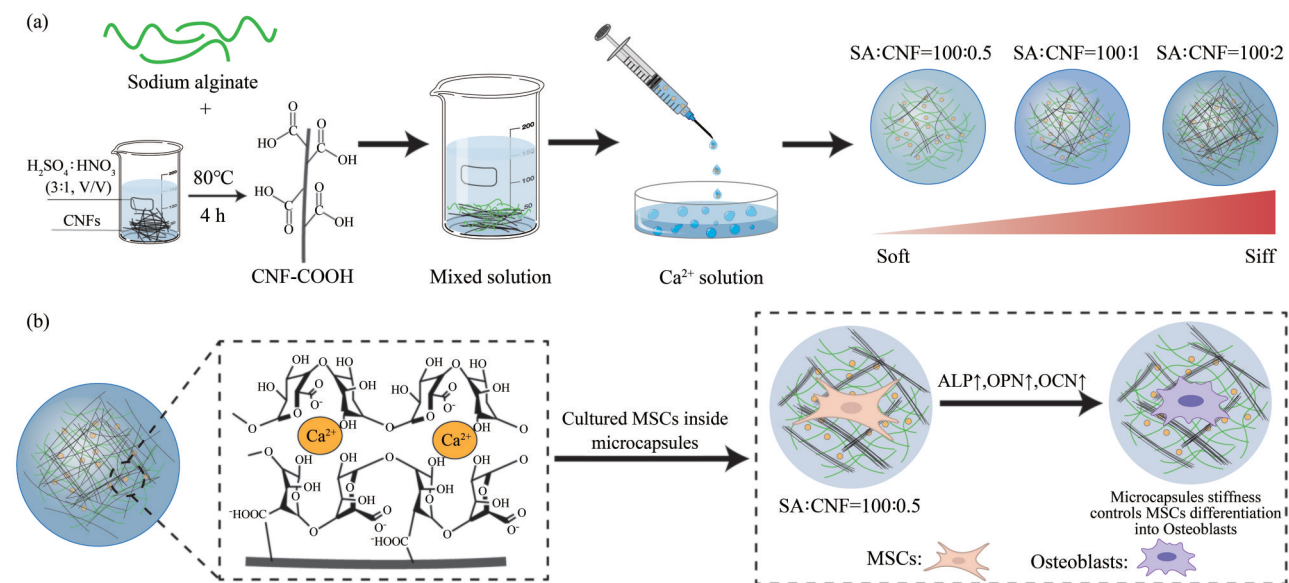


Fig. 1 Regulation of MSCs osteogenic differentiation by cell-laden microcapsules with tunable stiffness

(a) Schematic illustration of the fabrication process of cell-laden microcapsules with different matrix stiffness. (b) Schematic representation of stiffness-dependent regulation of MSCs osteogenic differentiation within microcapsules.

酸/浓硝酸混酸中, 于 $80^\circ C$ 条件下超声处理 4 h。反应结束后, 以大量去离子水稀释, 并用氨水调节溶液 pH 至 7.0。随后采用真空抽滤收集酸化 CNF, 经真空干燥至恒重后研磨, 备用。

1.2.2 不同基质刚度细胞微囊的制备

分别制备低、中、高刚度 CNF/SA 水凝胶微球, 其中 CNF 与 SA 的质量比分别为 0.5 : 100、1 : 100 和 2 : 100。按照上述配比称取 SA 和酸化处理后的 CNF, 加入去离子水充分搅拌形成均一前驱液。随后利用 5 ml 注射器将前驱液逐滴滴加至以 200 r/min 持续搅拌的 20% (质量百分比) $CaCl_2$ 溶液中进行离子交联, 胶化 10 min 后取出微球, 并用 PBS 充分冲洗以去除残留 $CaCl_2$, 最终获得不同刚度的微囊。

1.2.3 MSCs 的负载

MSCs 取自 SD 大鼠股骨和胫骨骨髓, 负载于微囊内部采用显微注射法完成。取 P2~P3 代 MSCs, 消化并离心后制备成 $5 \times 10^6/L$ 的单细胞悬液。将预先处理并经 PBS 充分清洗的不同刚度微囊置于培养板中, 采用 34 G 显微注射针将细胞悬液注入微囊内部。注射完成后保留针头 3 h, 随后将细胞负载微囊转移至 24 孔板中, 拔除针头并缓慢加入完全培养基进行培养, 每 2 d 更换一次培养液。3 组微囊均采用相同浓度的细胞悬液及一致的

注射和培养条件, 以减少初始细胞负载差异。

1.2.4 微囊的粒径统计

制备完成后的微囊置于 PBS 缓冲液中, 随后在倒置光学显微镜下观察并拍照。每组随机选取多个视野, 采用 ImageJ 软件统计微囊的粒径。

1.2.5 微囊的体外降解检测

称取 3 组微囊记为 W_0 , 将各组微囊置于含 PBS 缓冲液的离心管中, 于 $37^\circ C$ 恒温培养箱内进行体外降解实验, 每 2 d 更换一次 PBS。在预设时间点取出微囊, 用滤纸轻轻吸去表面水分后称量剩余质量记为 W_n ($n=1, 2, 3, \dots, 14$, 对应实验天数)。根据不同时间点微囊的质量变化计算降解率 De , 如公式 (1)。以评价 3 组微囊的体外降解性能。

$$De = \frac{W_0 - W_n}{W_0} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.6 傅里叶红外光谱分析微囊样品化学组成

将制备的各组微囊样品冷冻干燥后研磨并压制成片, 用于傅里叶红外光谱 (Fourier infrared spectroscopy, FTIR) 分析。测试前, 首先采用空白样品进行背景扫描, 完成后用酒精清洁样品测试平台。随后将样品置于测试台并压紧固定, 在 $4000 \sim 500 \text{ cm}^{-1}$ 波数范围内采集红外光谱, 分析不同微囊样品的化学组成及特征官能团变化, 以评价 CNF 与 SA 之间的相互作用及复合材料的结构特征。

1.2.7 质构分析仪检测微囊刚度

使用连接有25 N力传感器的质构分析仪进行单个微囊的单轴压缩。微囊被浸没在PBS水溶液中并放置在平台上,使用具有末端的探针来压缩珠子。在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的环境温度下,以40 mm/min的速度进行单轴压缩测试。100%变形作为压缩测试终点,弹性模量采用初始0~10%变形区间的力-位移数据。探针在压缩完成后立即返回其原始位置。压缩在两个平面刚性表面之间的弹性球形颗粒的接触力学可以用赫兹理论来描述。根据赫兹理论,球形弹性质点对刚性板的力 F 与变形 H 之间的关系可以用以下公式(2)和(3)表示:

$$F = \frac{4R^{1/2}}{3} \times \frac{E}{1-v^2} \times \left(\frac{H}{2}\right)^{3/2} \quad (2)$$

$$E = \frac{3(1-v^2)}{4R^{1/2}} \times \frac{F}{\left(\frac{H}{2}\right)^{3/2}} \quad (3)$$

其中 F 是施加的外部法向力, R 是接触变平前球体曲率的初始半径, H 是微囊变形的位移, E 是材料的弹性模量, v 是泊松比,泊松比设定为0.5。

1.2.8 不同刚度微囊的表面微观形貌观察

采用SEM观察不同刚度微囊的表面微观形貌。测试前,将微囊从PBS溶液中取出,使用滤纸轻轻吸去表面水分,并固定于导电胶上,经喷金处理后置于SEM下进行观察和拍照,对比分析不同刚度微囊的表面形貌及微观结构特征。

1.2.9 Live/dead染色

采用FDA/PI双荧光染色法评价微囊中细胞的存活情况。培养3 d后,弃去培养基,用PBS缓冲液清洗3次,加入现配制的FDA/PI工作液(250 μl /孔),室温避光孵育5 min,再次用PBS缓冲液清洗3次。随后采用激光共聚焦显微镜进行观察,其中FDA经活细胞内酯酶水解后发出绿色荧光,标记活细胞;PI可穿透受损细胞膜并与DNA结合,发出红色荧光,标记死细胞。

1.2.10 免疫荧光染色

培养结束后弃去培养基,PBS清洗细胞3次,5 min/次。随后加入4%多聚甲醛室温固定15 min,PBS清洗3次。加入0.25% Triton X-100室温透化10 min,PBS清洗3次后,以1%牛血清白蛋白室温封闭30 min。随后加入一抗(1:100稀释),于4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜。次日用PBS清洗3次,5 min/次,加入Alexa Fluor 488标记的荧光二抗,避光孵育

60 min,再次用PBS清洗3次,激光共聚焦荧光显微镜观察并采集图像。

1.2.11 ALP活性检测

培养结束后,用PBS清洗细胞3次,并采用ALP固定液固定3 min,再次PBS清洗3次后,加入100 μl ALP孵育液,于避光条件下孵育20 min,随后使用核固红染液复染3 min,PBS清洗后进行显微镜观察。

同时采用ALP活性检测试剂盒对培养7 d后包裹于微囊中的细胞进行定量分析。将微囊样品加入提取液中充分研磨,4 $^\circ\text{C}$ 、10 000 r/min离心10 min,取上清液用于后续检测。按照试剂盒说明书配置反应体系,将样品与相应试剂混匀后置于37 $^\circ\text{C}$ 水浴中孵育15 min,随后使用分光光度计测定吸光度值。活性单位定义:37 $^\circ\text{C}$ 每毫升上清液每分钟催化产生1 μmol 酚为一个酶活力单位:

ALP酶活力 =

$$\left[C \times (A_0 - A_1) \div (A_3 - A_2) \right] \times V \div T \quad (4)$$

其中, C 为标准品浓度,具体值为2.5 mmol/L, A_0 、 A_1 、 A_2 、 A_3 分别为测定管、对照管、空白管、标准管的吸光度值, V 为上清液体积, T 为反应时间。

1.2.12 微囊大鼠皮下埋植和H&E染色

SD大鼠经腹腔注射10%水合氯醛进行麻醉后剃除背部毛发,碘伏消毒。沿背部纵向切开3个间隔约1 cm的小切口,钝性分离皮下组织后,将3组微囊分别植入皮下间隙,逐层缝合切口并再次消毒。植入30 d后处死动物,取出背部植入物经4%多聚甲醛固定24 h后行石蜡包埋。组织依次经梯度乙醇脱水、二甲苯透明及石蜡浸蜡后包埋成块,切片厚度为7 μm ,展片于40 $^\circ\text{C}$ 水浴中并贴片,65 $^\circ\text{C}$ 烤片备用。切片经二甲苯脱蜡后,依次通过梯度乙醇复水,苏木精染色10 min,1%盐酸酒精分化20 s,随后伊红染色1 min,再次经梯度乙醇脱水及二甲苯透明,最后使用中性树胶封片,采用光学显微镜观察。

1.2.13 Masson三色染色

石蜡切片首先在65 $^\circ\text{C}$ 烘箱中烘烤1 h,随后依次经二甲苯脱蜡(10 min $\times$ 2)及梯度乙醇复水(无水乙醇5 min $\times$ 2,75%乙醇5 min),再用蒸馏水清洗3次。切片经苏木精染色10 min后,用1%盐酸酒精分化20 s,并再次水洗。随后依次经85%和95%乙醇快速脱水后,加入丽春红酸性品红染液染色10 min。用2%冰醋酸短暂洗涤后,置于1%磷

钼酸溶液中分化 5 min, 再用苯胺蓝染色 5 min, 随后以 2% 冰醋酸洗涤去除背景染色, 最后使用中性树胶封片, 光学显微镜观察。

1.2.14 茜素红S染色

样品首先用 4% 多聚甲醛在室温下固定 60 min, 并进行常规石蜡包埋。切片制备后依次经二甲苯脱蜡 (5 min×2) 及梯度乙醇复水处理。随后在切片上滴加茜素红 S 染液染色 2 min, 并用去离子水快速冲洗以去除多余染料。随后加入固绿染液染色 1 min, 再次置于去离子水中浸洗 3 min×2 以去除背景染色。切片依次经梯度乙醇脱水并通过二甲苯透明处理 (5 min×2), 最后滴加中性树脂并盖片封固, 光学显微镜下观察。

1.2.15 免疫组化染色

石蜡切片首先经二甲苯脱蜡 (5 min×2) 后, 依次通过梯度乙醇复水 (100%、95%、75%、50% 乙醇及双蒸水, 各 5 min)。随后在 95 °C 条件下采用 0.01 mol/L 柠檬酸钠缓冲液 (pH 6.0) 进行抗原修复 30 min, 自然冷却后用 PBS 冲洗。加入内源性过氧化物酶阻断液室温孵育 10 min 以封闭非特异性反应位点, PBS 清洗后进行一抗孵育 (1:200, 4°C 过夜)。次日 PBS 洗涤 3 次后, 加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗, 于 37°C 孵育 20 min, 再次 PBS 清洗后使用 DAB 显色 5 min, 显微镜下控制显色反应。自来水终止反应后, 经梯度乙醇脱水及二甲苯透明处理, 最后用中性树脂封片并进行显微镜观察。采用 Image J 软件对染色结果进行半定量分析, 每组至少选取 3 张图像, 计算平均光密度值用于比较不同组间蛋白表达差异。

1.2.16 统计学分析

数据以平均值±标准差表示。使用单因素方差 T 检验确定两组之间的统计显著性以进行两组比较。使用单向方差分析确定比较多个组的统计显著性, 分别使用 Tukeys 或 Games-Howell 事后检验来检验同质或非同质方差。* $P<0.05$ 和 ** $P<0.01$ 表示具有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同刚度微囊的制备与表征

本研究通过调整 CNF 和 SA 的质量比, 采用 Ca^{2+} 双交联机制同时交联海藻酸盐链和 CNF, 制备不同刚度的 CNF/SA 水凝胶微囊, 模拟组织细胞微环境。首先对不同基质刚度微囊进行大体观察 (图 2a), 结果表明, 3 组微囊平均粒径均约为

1.85 mm, 无显著差异 (图 2b), 该结果可能与采用相同规格注射针挤出成型有关, 微囊尺寸主要受针头直径控制。3 组微囊的环境扫描电子显微镜观察结果可以观察到 (图 2c), 微囊形貌较为规则, 表面呈圆整且轻微褶皱结构, 粒径分布均一性良好。在部分区域可见片状结构, 其形成可能与凝胶滴在成型过程中受空气扰动或进入 CaCl_2 交联液时界面张力作用有关。相比之下, 中等刚度组微囊表面褶皱程度略高, 可能与其脱水收缩行为相关。高倍电镜观察进一步显示, 各组微囊微观结构整体均一, 说明少量 CNF 的引入未对微囊的基本形貌造成显著影响。此外, 较为致密的表面结构有助于维持微囊稳定性, 并为内部细胞提供一定的免疫隔离屏障。3 组微囊的 FTIR 结果显示 (图 2d), 在约 $3\ 310\ \text{cm}^{-1}$ 处均出现较宽的 O-H 伸缩振动吸收峰, 在约 $1\ 632\ \text{cm}^{-1}$ 处可观察到海藻酸盐羧酸根相关特征吸收峰, 在约 $1\ 045\ \text{cm}^{-1}$ 处出现多糖骨架 C—O 相关伸缩振动吸收峰。3 组样品主要特征峰位置整体一致, 表明不同 CNF 含量微囊的主体化学结构基本一致。部分峰强度的变化可能与 CNF 引入后 CNF 与 SA 之间的局部相互作用有关。整体来看, 3 组微囊在特征官能团类型上基本一致, 表明其主体化学结构未发生明显改变。然而, 不同组在 $1\ 045\ \text{cm}^{-1}$ 处峰强存在一定差异, CNF 的引入可能与海藻酸钠之间发生了局部相互作用或交联作用, 从而引起该区域振动信号的变化。

通过质构分析仪对微囊进行压缩测试, 做出应力-应变曲线 (图 2e)。经过赫兹公式分析得出 3 组微囊平均刚度分别为 (27.05 ± 6.82) 、 (35.90 ± 1.97) 、 (52.40 ± 8.29) kPa (图 2f)。3 组微囊在刚度特性上存在显著性差异, 表明通过 CNF 可有效提升微囊的刚度特性, 高浓度的 CaCl_2 可以将 CNF 与 SA 交联起来, 利用 CNF 优异的机械特性来改进 SA 微囊的物理性能是一个可行的思路和方法。体外降解实验结果显示, 各组微囊降解率分别为 27.6%、24.7% 和 29.5%, 整体表现出良好的可降解性 (图 2g)。

2.2 细胞微囊的细胞相容性

为评价不同刚度微囊对 MSCs 生长行为的影响, 通过 Live/dead 对细胞在微囊内部 (图 3a) 及表面 (图 3b) 的存活和分布状态进行观察。结果显示, 培养 3 d 后, 各组细胞均表现出良好的存活状态。低刚度微囊中 MSCs 多呈圆形, 部分出现脱落现象。中等及高刚度组细胞则逐渐铺展, 呈典型

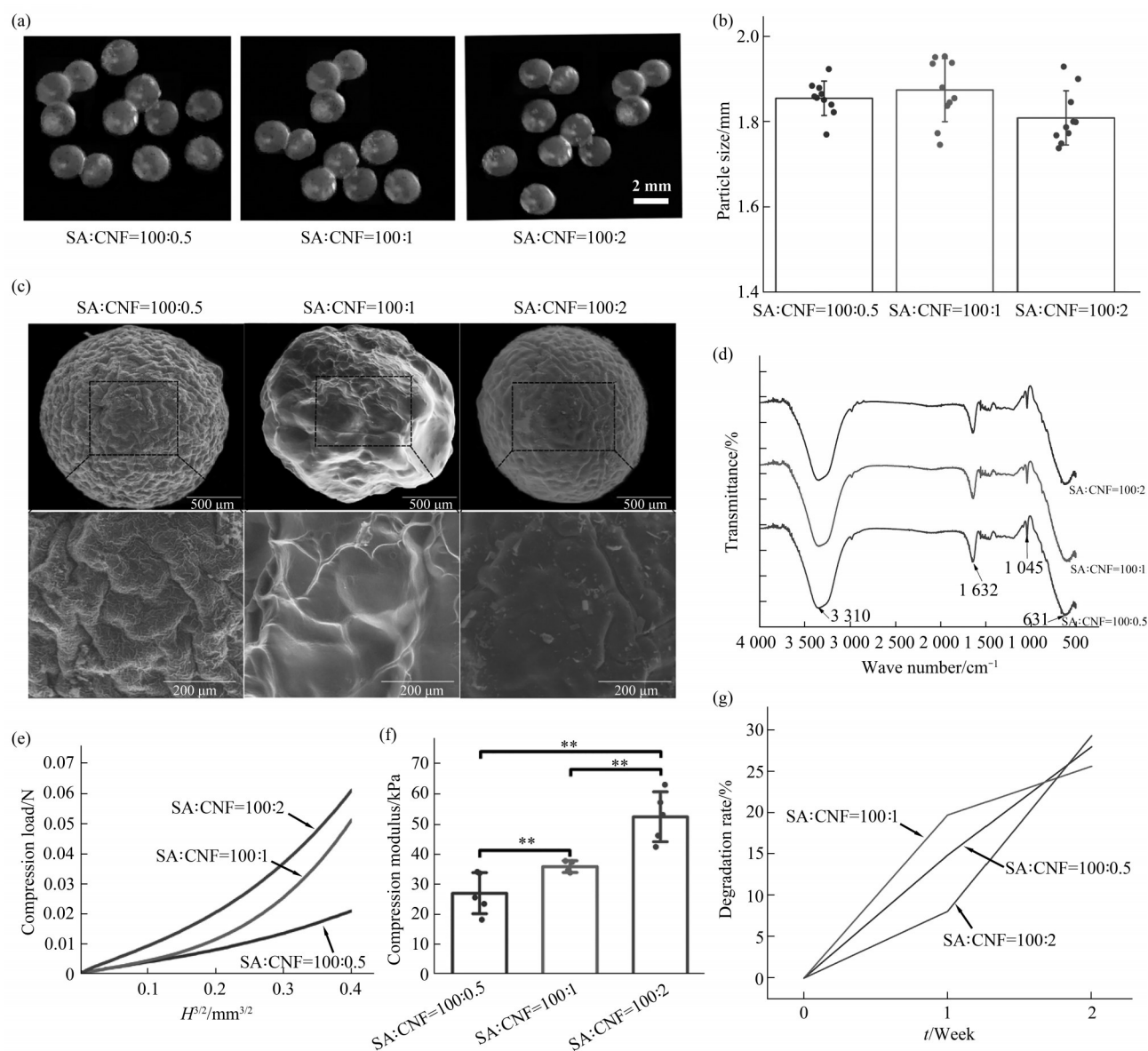


Fig. 2 Fabrication and characterization of microcapsules with different stiffness

(a) Macroscopic images of microcapsules with different stiffness. (b) Particle size distribution of the microcapsules. (c) SEM images of cell-laden microcapsules. (d) FTIR spectra of microcapsules. (e) Representative stress-strain curves of microcapsules with different stiffness. (f) Compressive modulus of microcapsules in each group. (g) Degradation rate of microcapsules. ** $P < 0.01$.

伸展形态。相较之下, 3组微囊表面负载的细胞均表现出明显铺展并呈索状紧密排列。随着基质刚度增加, 无论微囊内部还是表面, 细胞保留数量均有所增加, 较高刚度更有利于细胞黏附, 并维持较高的细胞存活水平。此外, 观察发现部分注入微囊内部的细胞倾向于聚集于表层区域, 可能与微囊表层溶解氧浓度较高及局部代谢条件更有关, 从而促进细胞存活与迁移行为。

2.3 微囊基质刚度对MSCs成骨分化的影响

为进一步评估不同基质刚度微囊对MSCs体外成骨分化能力的影响, 分别进行了ALP染色及ALP活性定量分析。ALP染色结果显示, 培养7 d后各组细胞均呈现不同程度的阳性表达, 其中深紫色代表ALP活性较高。随着微囊基质刚度的增加, ALP染色强度逐渐增强(图4a)。然而, 高刚度组由于CNF含量较高, 其黑色背景对紫色染色信号

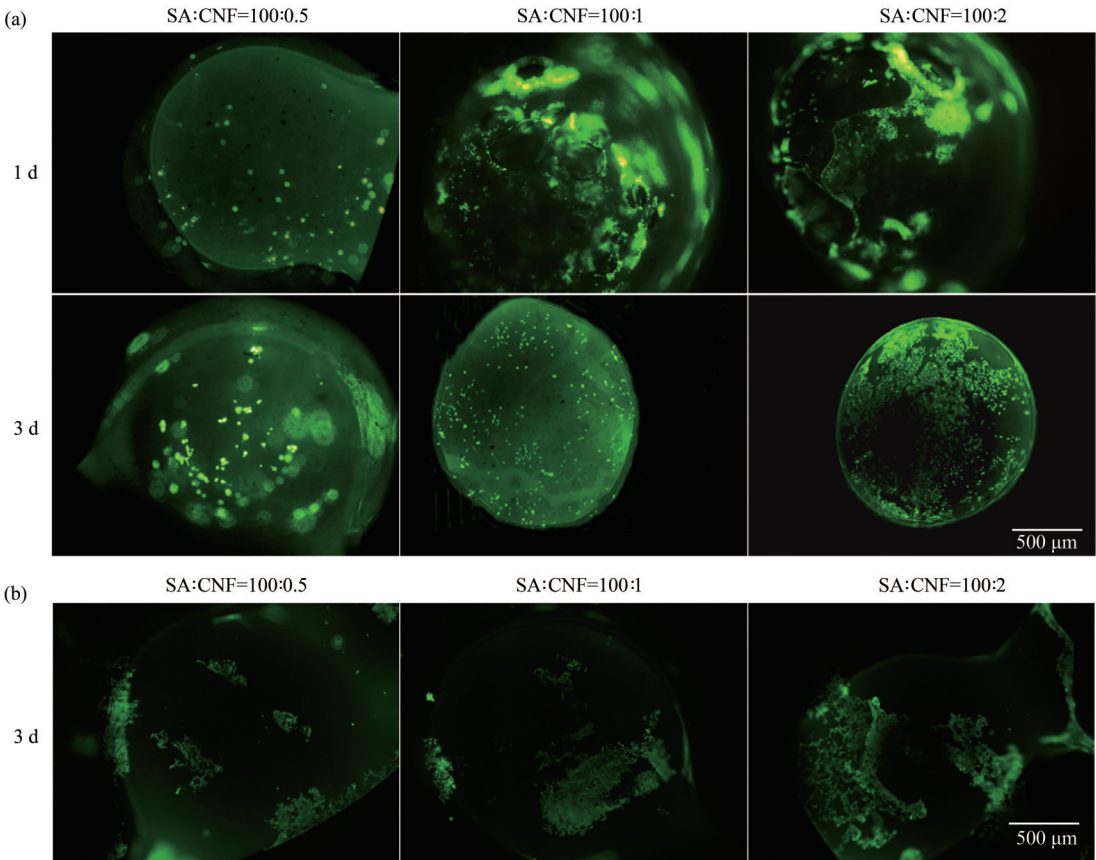


Fig. 3 Cytocompatibility of cell microcapsules
(a) Live/dead staining inside cell microcapsules after 1 and 3 d of culture. (b) Live/dead staining on the surface of cell microcapsules after 3 d of culture.

存在一定遮蔽效应,使得直观对比略受影响。为进一步明确差异,通过分光光度法对ALP活性进行定量分析(图4b)。结果表明,3组复合微囊中MSCs的ALP活性分别为(58.22±2.811 457) U/L、(95.71±2.008 183) U/L和(176.94±2.812 164) U/L,单因素方差分析显示组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。随着基质刚度的增加, MSCs的成骨分化水平显著提高。需要指出的是,ALP活性结果未按细胞数量或DNA含量进行归一化,因此其绝对水平可能同时受到细胞数量差异的影响,本研究主要依据其组间变化趋势并结合OPN、OCN等成骨指标进行综合判断。

通过免疫荧光染色检测成骨相关标志蛋白OPN和OCN的表达情况(图4c)。MSCs在不同刚度微囊中培养14 d后,OPN表达随基质刚度增加而增强。各组之间存在一定差异,其中低刚度组OPN阳性信号较弱,可能与成骨分化进程较慢及培养时间尚短有关,导致荧光信号不易检测。

OCN表达趋势与OPN基本一致,高刚度组OCN阳性表达最为明显,并随基质刚度提升呈增强趋势。

为进一步观察不同基质刚度下整合素β1/Yes相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)相关机械转导信号的变化,本研究检测了整合素β1及YAP的表达情况。本研究进一步检测了整合素β1及YAP的表达情况。MSCs在不同刚度微囊中培养7 d及14 d后,YAP免疫荧光结果显示,其表达总体随基质刚度增加而增强。培养14 d后,高刚度组YAP阳性信号较低刚度组明显升高,但中刚度组与高刚度组之间差异不显著,说明刚度对YAP表达具有促进作用,但在一定范围内存在平台效应(图4d)。整合素β1的表达趋势与YAP基本一致,随基质刚度增加呈上升趋势(图4e)。综合结果表明,基质刚度可能通过调控整合素β1介导的细胞黏附信号,影响YAP的表达与激活状态,从而参与调控MSCs向成骨谱系分化的过程。

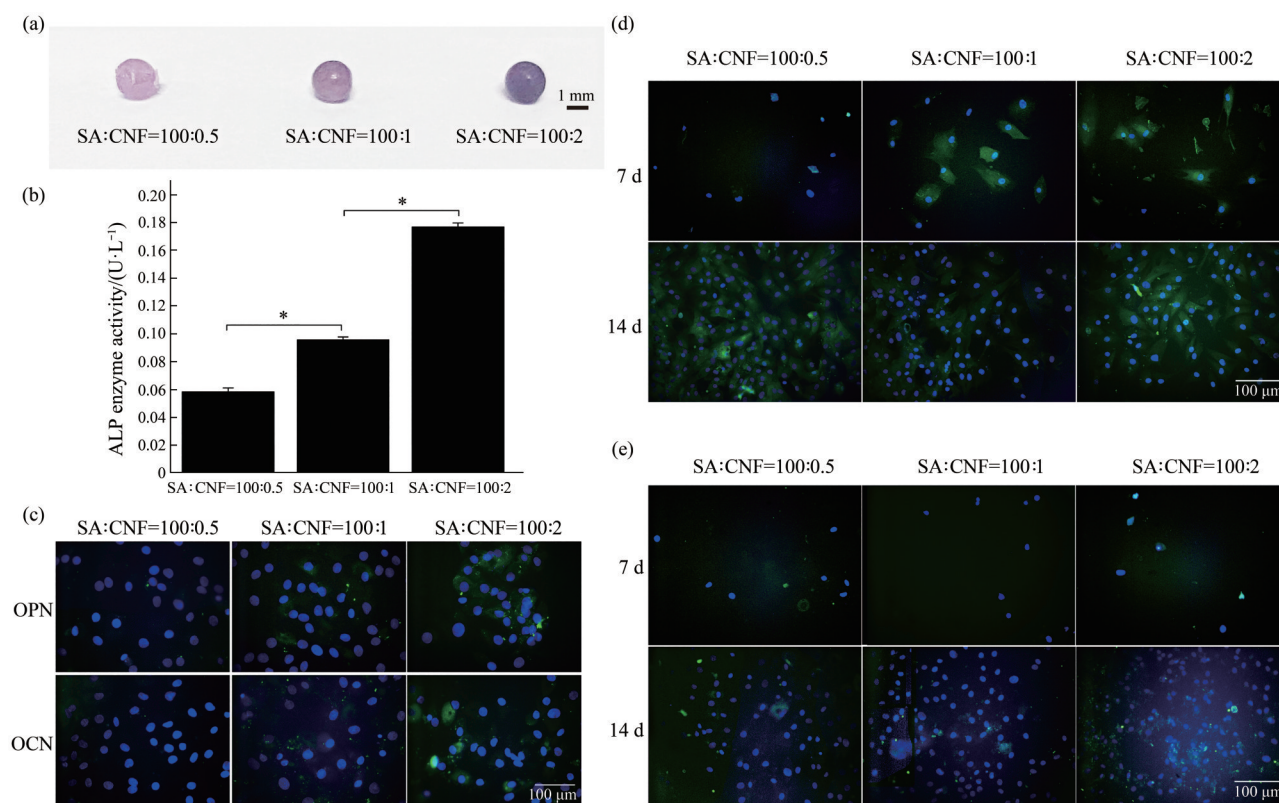


Fig. 4 The effect of scaffolds with different matrix stiffnesses on the osteogenic differentiation of MSCs

(a) ALP staining results of cell microcapsules *in vitro*. (b) *In vitro* ALP assay results of cell microcapsules. (c) OPN and OCN immunofluorescence staining results after 14 d of *in vitro* co-culture of cell microcapsules. (d) YAP immunofluorescence staining results after 7 and 14 d of *in vitro* co-culture of cell microcapsules. (e) Integrin β1 immunofluorescence staining results after 7 and 14 d of *in vitro* co-culture of cell microcapsules. * $P < 0.05$.

2.4 皮下埋植评价不同刚度微囊在体组织相容性

将各组微囊皮下植入大鼠体内1个月取材进行H&E染色分析。结果显示, 各组微囊在植入后均发生一定程度的降解, 整体球形结构不再完整, 其中高含CNF组微囊降解程度最为明显。同时, 3组微囊表面均可观察到不同程度的炎症细胞浸润及新生血管形成, 但微囊内部未见明显细胞长入, 其仍具有一定的免疫隔离功能。其中, 3组均未出现严重的炎症反应, 高刚度组炎症细胞浸润情况相较于其余两组更严重(图5a)。不同基质刚度可调控体内组织反应及细胞浸润行为, 并在一定程度上维持微囊对内部细胞的保护作用, 从而为后续MSCs存活及组织再生提供局部微环境支持。

Masson染色用于评价植入部位胶原纤维与肌纤维的分布及沉积情况。大鼠皮下植入1个月后, 3组微囊表面均可观察到不同程度的组织包被, 其中肌纤维呈红色, 胶原纤维呈蓝色。低刚度组主要以肌纤维包绕为主, 未见明显胶原纤维沉积。中刚

度组表面可见少量胶原纤维形成, 而肌纤维减少。高刚度组同时存在明显肌纤维与胶原纤维包被, 且蓝色胶原染色更为明显(图5b)。随着微囊基质刚度增加, 植入部位胶原纤维沉积逐渐增强, 较高刚度更有利于促进局部细胞外基质重塑及胶原生成, 从而改善植入材料的组织整合能力。

2.5 皮下埋植评价不同刚度微囊骨诱导能力

为评价体内植入后内源性细胞的成骨分化情况, 对植入1个月后的组织切片进行了OPN免疫组化染色(图6a)及半定量分析(图6b)。结果显示, 随着微囊基质刚度的增加, OPN阳性表达逐渐增强。3组微囊的平均光密度分别为 $0.169\ 79 \pm 0.025\ 42$ 、 $0.248\ 96 \pm 0.007\ 99$ 和 $0.266\ 59 \pm 0.003\ 60$, 组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明, 高刚度微囊更有利于促进体内MSCs向成骨谱系分化, 从而增强局部成骨相关蛋白表达水平。

不同基质刚度微囊植入大鼠皮下1个月后的OCN免疫组化染色结果显示, 3组微囊表面均可观

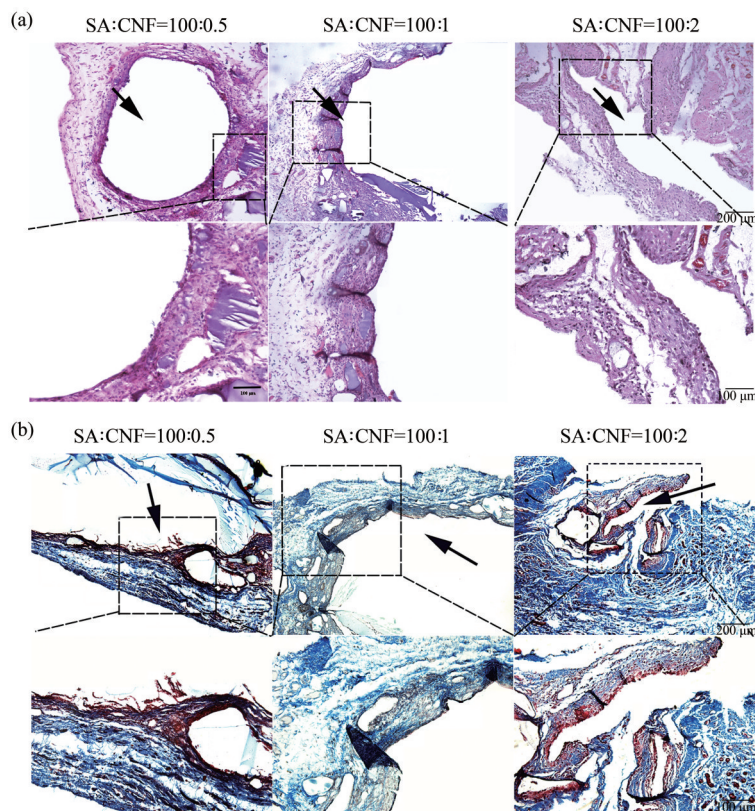


Fig. 5 Evaluation of microcapsule tissue compatibility *via* subcutaneous implantation in rats

(a) H&E staining results of microcapsule subcutaneous implantation. (b) Masson staining of microcapsule subcutaneous implantation.

观察到明显的OCN阳性表达 (图6c)。进一步半定量分析显示, 3组微囊OCN平均光密度值分别为 $0.129\ 11 \pm 0.004\ 01$ 、 $0.138\ 23 \pm 0.010\ 28$ 和 $0.154\ 23 \pm 0.001\ 37$, 组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图6d)。OCN表达受微囊基质刚度调控, 在27~52 kPa范围内, 随着刚度增加, OCN表达水平逐渐升高, 表明较高刚度更有利于促进体内成骨相关蛋白质表达及骨形成过程。

为确定成骨谱系细胞钙化沉积的存在, 对3组微囊植入大鼠皮下的结果进行了茜素红S染色分析。3组微囊表面均存在一定程度的钙盐沉积, 其中低刚度组沉积较少且染色较浅, 并伴随少量固绿背景。中刚度组与高刚度组均表现出明显的钙化沉积, 染色更为密集且强度更高, 二者之间亦存在一定差异。随着基质刚度增加, 微囊对体内内源性细胞成骨分化的促进作用逐渐增强 (图6e)。然而, 中、高刚度组染色结构相对较为碎片化, 可能与局部炎症细胞浸润增加及微囊降解加快有关, 从而影响钙化沉积的连续性。

3 讨 论

临床上越来越需要开发可用于治疗不规则骨缺损的新型生物材料, 聚合物水凝胶因其可原位成胶、可负载细胞及生长因子并构建类ECM的三维微环境而受到广泛关注^[24-25]。其中, SA来源于褐藻, 由 β -D-甘露糖醛酸与 α -L-古洛糖醛酸构成, 可通过 Ca^{2+} 诱导形成“蛋壳”结构实现凝胶化, 具有良好的生物相容性与可降解性^[26]。CNF作为一维碳纳米材料, 具有优异的力学性能与较低制备成本, 可显著增强复合体系的结构强度^[27]。本研究通过 Ca^{2+} 交联引入极低含量CNF, 实现SA微囊刚度调控, 构建3组力学差异显著的细胞递送体系。结果显示, 各组微囊粒径均一 ($< 2\ \text{mm}$), 降解行为稳定。FTIR及SEM分析表明其化学组成与微观结构无明显差异, 为后续MSCs力学响应研究提供一致平台。尽管CNF含量变化可能同时影响材料的其他物理化学性质, 但本研究中3组微囊在粒径、整体形貌、主要化学结构及早期降解行为方面

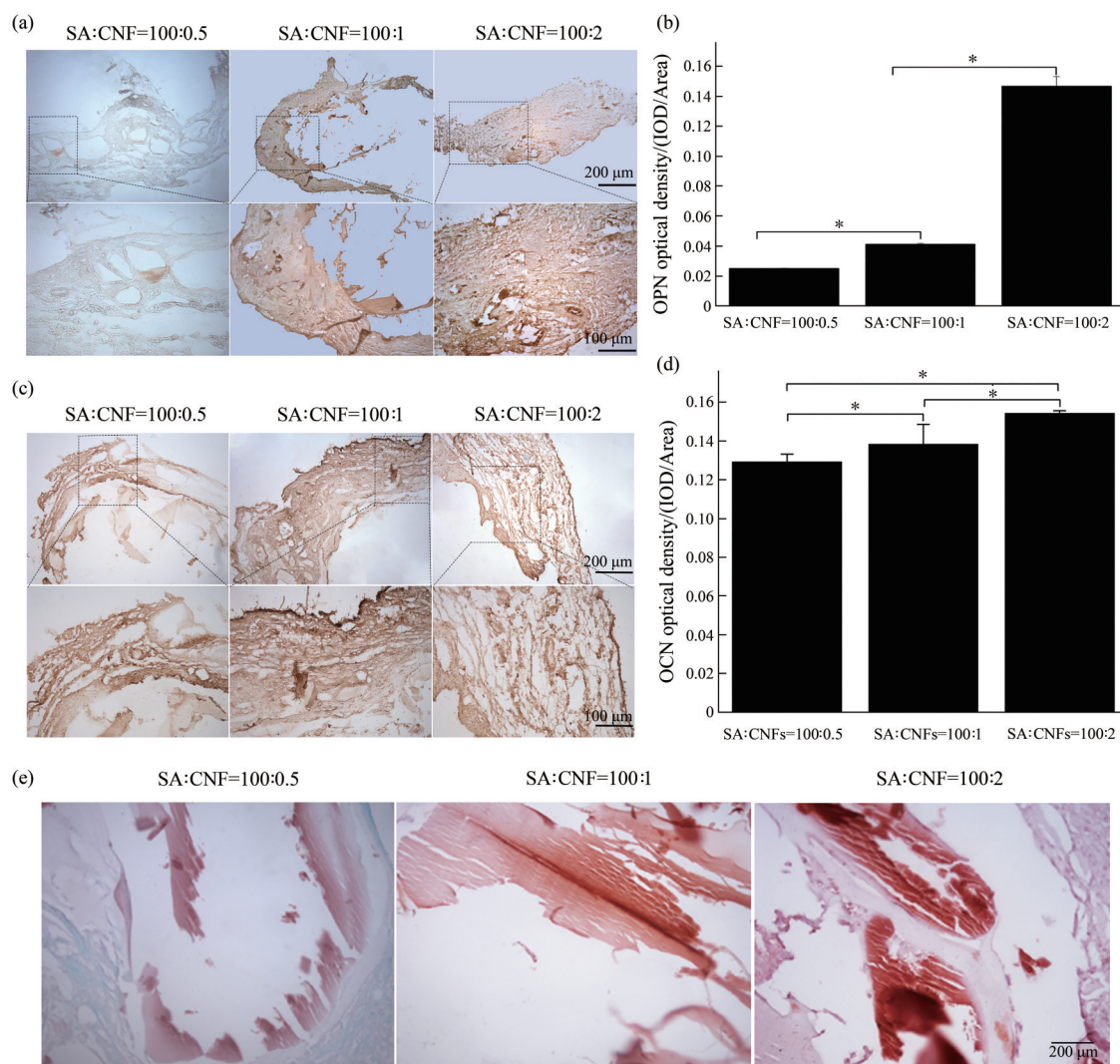


Fig. 6 A subcutaneous implantation study evaluating the bone induction capabilities of microcapsules with different stiffnesses

(a) OPN staining of microcapsule subcutaneous implantation. (b) OPN optical density semi-quantitative statistics. (c) OCN staining of microcapsule subcutaneous implantation. (d) OCN optical density semi-quantitative statistics. (e) Alizarin red staining of microcapsules implanted subcutaneously. * $P < 0.05$.

均保持较好一致性，而力学性能存在显著差异。因此，观察到的MSCs成骨分化差异与微囊力学环境变化具有较强相关性。后续可通过进一步控制CNF含量或交联条件，对刚度的独立作用进行更深入验证。本研究体外降解实验仅观察至14 d，主要用于比较不同刚度微囊早期降解行为及组间差异，尚不能完全反映30 d植入周期内的长期降解特征，后续仍需延长观察时间进一步评价其长期降解行为。此外，本研究主要评价了微囊制备后的初始力学性能。 Ca^{2+} 交联海藻酸盐在培养过程中可能受到离子交换等因素影响，其刚度可能随培养时间发生变化，后续仍需进一步评价微囊长期培养过程中

的力学稳定性。

MSCs的命运受到其微环境多因素调控，其中物理性参数如基质刚度在细胞增殖与分化过程中具有关键作用。基质刚度可通过调节细胞因子分泌、氧化应激水平及蛋白质表达谱，进而影响MSCs的表型转变及谱系^[28-30]。较高刚度通常促进其向成骨方向分化，并改变细胞在基质表面的分布状态。这一刚度依赖性分化规律在二维及三维体系中均已得到验证，且在三维水凝胶体系中同样表现为刚度升高促进成骨相关基因表达增强^[31]。本研究从SD大鼠分离获取原代MSCs，经多次传代纯化后，采用显微注射法将细胞负载于不同刚度微囊内部培养，

通过 Live/Dead 染色评估细胞存活情况。并进一步检测 ALP 活性及 OPN、OCN 表达水平, 以评价早期成骨分化特征。同时, 从力学信号转导角度出发, 检测整合素 $\beta 1$ 及 YAP 表达, 用于初步观察整合素 $\beta 1$ /YAP 相关机械转导信号与基质刚度及 MSCs 成骨分化之间的关联, 从而评估基质刚度对 MSCs 成骨行为的调控效应。已有研究表明, 整合素介导的细胞-基质结合是 MSCs 感知刚度变化的关键起点, 其可通过 FAK/Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 (Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase, ROCK) 等信号通路调控细胞骨架张力, 并进一步影响下游成骨分化过程^[32]。同时, YAP 作为 Hippo 通路核心效应分子, 其核转位已被证实直接受基质刚度调控, 并参与调节 MSCs 成骨相关基因表达^[33]。在成骨分化过程中, ALP 活性升高通常代表 MSCs 成骨谱系启动, 而 OPN 和 OCN 表达增强则反映细胞外基质成熟及矿化过程的进一步推进^[34]。因此, 随着基质刚度增加, 细胞受到更强的力学刺激后, 可能促进 MSCs 由早期成骨逐渐向成熟成骨表型转变, 从而表现为 ALP 活性、OPN/OCN 表达以及矿化沉积的同步增强。本研究中高刚度微囊组整合素 $\beta 1$ 和 YAP 表达升高, 可能参与了这一刚度依赖性的成骨调控过程。此外, CNF 具有一定的吸光和散射特性, 可能对荧光成像及比色检测产生背景影响。因此, 本研究更侧重于不同检测指标之间的一致性趋势, 后续仍需通过统一曝光条件下的定量分析、无细胞材料空白校正及 DNA 归一化进一步提高定量结果的可靠性。

皮下埋植实验用于评价植入材料对局部组织反应的影响, 是组织相容性及异位成骨能力评价的常用方法, 可用于分析炎症反应、纤维化程度、细胞浸润及新生血管形成等过程。异位成骨模型在机制上与正位成骨具有一定相似性, 同时可避免受宿主骨及骨膜来源干扰, 可用于解析新生骨形成的细胞来源及调控因素^[34]。本研究通过将不同基质刚度微囊植入 SD 大鼠皮下 1 个月, 评估其体内组织反应及成骨潜能。H&E 染色结果显示, 各组微囊内部均未见明显细胞浸润, 但表面可见一定程度血管生成, 说明微囊结构在维持免疫隔离的同时具备一定的组织相互作用能力。其中高刚度组降解更为明显, 可能与炎症细胞黏附增强相关。Masson 染色结果表明, 各组均可促进胶原纤维沉积。基质刚度对体内组织重塑的影响不仅体现在细胞分化层面, 还涉及宿主免疫反应与组织界面动态平衡。已有研

究表明, 不同力学性质的支架可显著改变宿主巨噬细胞极化状态, 从而影响后续组织修复模式^[35]。免疫组化分析显示, 不同刚度微囊对内源性细胞成骨分化具有调控作用, 高刚度组 OPN/OCN 表达更为显著。茜素红 S 染色进一步证实, 高刚度组钙化结节形成最为明显, 整体呈刚度依赖性增强趋势, 说明基质刚度可显著促进体内成骨微环境形成及内源性成骨分化过程^[36-37]。

4 结 论

本研究基于 CNF/SA 复合体系构建了 3 组具有明确力学梯度的 3D 细胞微囊, 并在结构一致的前提下实现了基质刚度的可调控。结果表明, 微囊在粒径、溶胀及降解行为上保持良好一致性, 而力学性能差异主要来源于 CNF 含量调控。体外实验显示, 较高刚度微囊可显著促进 MSCs 黏附与成骨分化, ALP 活性及 OPN、OCN 表达均呈增强趋势, 同时整合素 $\beta 1$ 与 YAP 表达上调, 说明微囊刚度可能通过机械转导轴参与调控细胞命运。体内皮下埋植结果进一步表明, 高刚度微囊能够促进植入区域成骨相关蛋白质表达及钙化沉积, 并表现出良好的组织相容性和一定的异位成骨潜能。

该类基于力学可调的微囊体系可进一步结合更宽范围的刚度梯度设计, 以更精细解析细胞力学响应阈值与动态变化规律。同时, 可引入特异性通路阻断或基因调控手段, 从整合素-FAK-YAP/具有 PDZ 结合基序的转录共激活因子 (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, TAZ) 等关键机械转导轴深入验证其分子机制, 并结合大尺寸骨缺损模型评估其在正位骨修复中的长期重建能力, 从而推动其向临床转化应用发展。

数据可用性声明 本篇论文的关联数据 (DOI: 10.57760/sciencedb. 012to; CSTR: 31253.11.sciencedb.012to) 可在 Science Data Bank 数据库 (<https://www.scidb.cn/s/jauqUb>) 中访问获取。

参 考 文 献

- [1] Chen R, Pye J S, Li J, *et al.* Multiphasic scaffolds for the repair of osteochondral defects: outcomes of preclinical studies. *Bioact Mater*, 2023, **27**: 505-545
- [2] Monaco E, Bionaz M, Hollister S J, *et al.* Strategies for regeneration of the bone using porcine adult adipose-derived mesenchymal stem cells. *Theriogenology*, 2011, **75**(8): 1381-1399
- [3] Chen Q, Shou P, Zheng C, *et al.* Fate decision of mesenchymal

- stem cells: adipocytes or osteoblasts?. *Cell Death Differ*, 2016, **23**(7): 1128-1139
- [4] Caplan A I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 1991, **9**(5): 641-650
- [5] Yang S, Li K, Wang N, *et al.* Engineering approaches to modify immunomodulatory functions of mesenchymal stromal cells (MSCs): tissue regeneration and clinical application. *Adv Sci*, 2026: e22601
- [6] Zhang A, Zhu S, Sun B, *et al.* 3D cell-laden scaffold printed with brain acellular matrix bioink. *J Nanobiotechnol*, 2025, **23**(1): 564
- [7] Ko J, Park D, Lee J, *et al.* Microfluidic high-throughput 3D cell culture. *Nat Rev Bioeng*, 2024, **2**(6): 453-469
- [8] Naba A. Mechanisms of assembly and remodelling of the extracellular matrix. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, **25**(11): 865-885
- [9] Engler A J, Sen S, Sweeney H L, *et al.* Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 2006, **126**(4): 677-689
- [10] Xu X, Zhang H, Li Y, *et al.* Chromatin remodeling and nucleoskeleton synergistically control osteogenic differentiation in different matrix stiffnesses. *Mater Today Bio*, 2023, **20**: 100661
- [11] Ueki A, Kidoaki S. Manipulation of cell mechanotaxis by designing curvature of the elasticity boundary on hydrogel matrix. *Biomaterials*, 2015, **41**: 45-52
- [12] Yang Y, Wang K, Gu X, *et al.* Biophysical regulation of cell behavior-cross talk between substrate stiffness and nanotopography. *Engineering*, 2017, **3**(1): 36-54
- [13] Gao C, Zeng Z, Peng S, *et al.* Magnetostrictive alloys: promising materials for biomedical applications. *Bioact Mater*, 2021, **8**: 177-195
- [14] Jiang S, Jing H, Zhuang Y, *et al.* BMSCs-laden mechanically reinforced bioactive sodium alginate composite hydrogel microspheres for minimally invasive bone repair. *Carbohydr Polym*, 2024, **332**: 121933
- [15] Yu J, Du K T, Fang Q, *et al.* The use of human mesenchymal stem cells encapsulated in RGD modified alginate microspheres in the repair of myocardial infarction in the rat. *Biomaterials*, 2010, **31**(27): 7012-7020
- [16] Li W, Feng S, Chen Z, *et al.* Dynamic stiffening hydrogels orchestrate macrophage- mesenchymal stem cells interactions for bone regeneration. *Biomater Adv*, 2026, **187**: 214974
- [17] Jeon H J, Park B Y, Min J H, *et al.* Development of sodium alginate/ cellulose nanofiber (SA/CNF) -based hydrogels for enhancing probiotic stability. *Gels*, 2026, **12**(6): 491
- [18] Lin X, Shi J, Meng G, *et al.* Effect of graphene oxide on sodium alginate hydrogel as a carrier triggering release of ibuprofen. *Int J Biol Macromol*, 2024, **260**: 129515
- [19] Li Y, Yang G, Wang Y, *et al.* Osteoimmunity-regulating nanosilicate-reinforced hydrogels for enhancing osseointegration. *J Mater Chem B*, 2023, **11**(41): 9933-9949
- [20] Hu J, Hu Y, Kang M, *et al.* Sodium alginate/carboxycellulose/ polydopamine composite microspheres for rapid hemostasis of deep irregular wounds. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2024, **238**: 113905
- [21] Llorens-Gómez M, Salesa B, Serrano-Aroca Á. Physical and biological properties of alginate/carbon nanofibers hydrogel films. *Int J Biol Macromol*, 2020, **151**: 499-507
- [22] Na J, Yang Z, Shi Q, *et al.* Extracellular matrix stiffness as an energy metabolism regulator drives osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *Bioact Mater*, 2024, **35**: 549-563
- [23] El-Rashidy A A, El Moshy S, Radwan I A, *et al.* Effect of polymeric matrix stiffness on osteogenic differentiation of mesenchymal stem/progenitor cells: concise review. *Polymers*, 2021, **13**(17): 2950
- [24] Xiang T, Hou J, Xie H, *et al.* Biomimetic micro/nano structures for biomedical applications. *Nano Today*, 2020, **35**: 100980
- [25] Chen J, Du C, Tang B, *et al.* Application and progress of smart hydrogel microspheres for regulating oxidative stress in osteoarthritis. *Chem Eng J*, 2025, **507**: 160620
- [26] Pan H, Pan X, Cao Z, *et al.* Self-expanding sodium alginate sulfate drug-loaded microspheres for stabilized arterial embolization. *Carbohydr Polym*, 2026, **380**: 125119
- [27] Wang Y, Zhang Y, Zhong H, *et al.* Construction of a non-toxic interpenetrating network hydrogel drug carrier supported by carbon microspheres and nanocellulose. *Carbohydr Polym*, 2025, **350**: 123035
- [28] Sun Y, Chen G, Lv Y. Effects of hypoxia on the biological behavior of MSCs seeded in demineralized bone scaffolds with different stiffness. *Acta Mech Sin*, 2019, **35**(2): 309-320
- [29] Chen Z, Lv Y. Uninterrupted dynamic stiffening microenvironment enhances the paracrine function of mesenchymal stem cells for vascularization through chromatin remodeling. *Mater Des*, 2022, **224**: 111328
- [30] Ji Y, Li J, Wei Y, *et al.* Substrate stiffness affects the immunosuppressive and trophic function of hMSCs *via* modulating cytoskeletal polymerization and tension. *Biomater Sci*, 2019, **7**(12): 5292-5300
- [31] Huebsch N, Arany P R, Mao A S, *et al.* Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate. *Nat Mater*, 2010, **9**(6): 518-526
- [32] Shih Y V, Tseng K F, Lai H Y, *et al.* Matrix stiffness regulation of integrin-mediated mechanotransduction during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res*, 2011, **26**(4): 730-738
- [33] Dupont S, Morsut L, Aragona M, *et al.* Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 2011, **474**(7350): 179-183
- [34] Zhang Y, Yu T, Xiang Q, *et al.* Osteoclasts drive bone formation in ectopic and orthotopic environments. *Biomaterials*, 2025, **322**: 123377
- [35] Di Rosa F. Maintenance of memory T cells in the bone marrow: survival or homeostatic proliferation?. *Nat Rev Immunol*, 2016, **16**(4): 271
- [36] Okazaki Y, Mahboob I, Onomitsu K, *et al.* Gate-controlled electromechanical backaction induced by a quantum dot. *Nat Commun*, 2016, **7**: 11132
- [37] Rufaihah A J, Yasa I C, Ramanujam V S, *et al.* Angiogenic peptide nanofibers repair cardiac tissue defect after myocardial infarction. *Acta Biomater*, 2017, **58**: 102-112

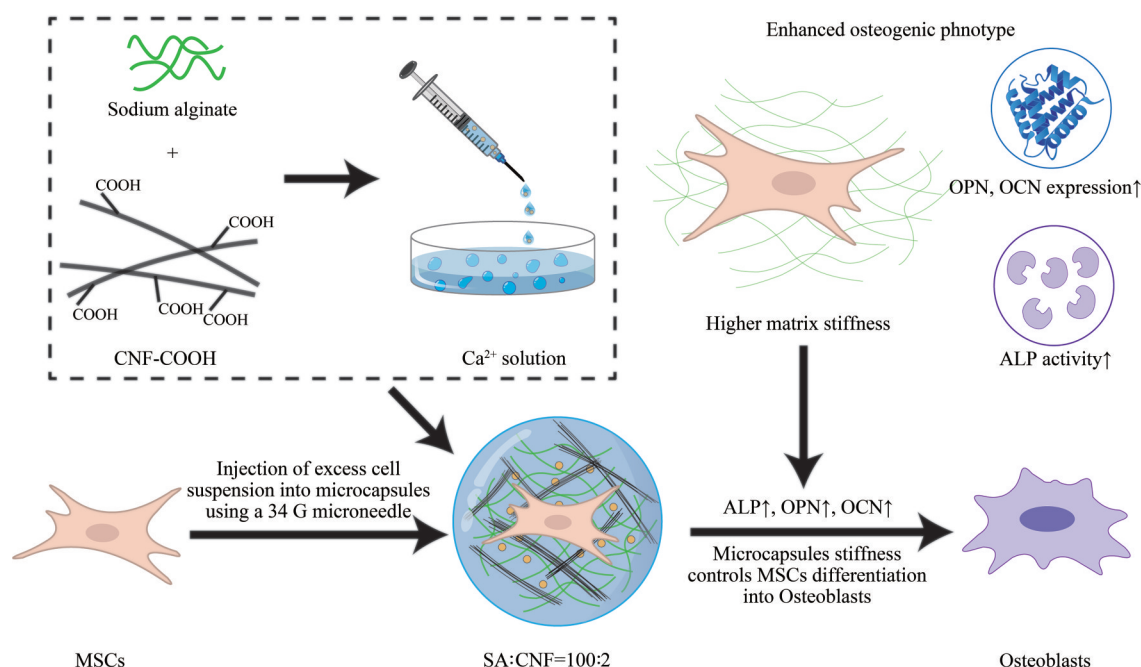
Microcapsule Matrix Stiffness Regulates Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and *in vivo* Evaluation*

LIU Si-Yuan^{1)**}, LU Tang-Fang^{1)**}, LÜ Yong-Gang^{2)***}, CHEN Guo-Bao^{1)***}

⁽¹⁾School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China;

⁽²⁾State Key Laboratory of New Textile Materials and Advanced Processing, Wuhan Textile University, Wuhan 430200, China)

Graphical abstract



Abstract Objective This study aims to investigate the regulatory effects of microcapsules with different matrix stiffness on the survival, proliferation, adhesion, and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs), to further explore the relationship between matrix stiffness and MSCs osteogenic behavior, and to evaluate the *in vivo* histological responses and osteogenic-related protein expression of the microcapsules using an animal subcutaneous implantation model. **Methods** In this study, three-dimensional carbon nanofiber (CNF)/sodium alginate (SA) microcapsules with different matrix stiffness were constructed. By adjusting the CNF content, three groups of microcapsules with stiffness values of 27.05, 35.90, and 52.40 kPa were prepared, and

* This work was supported by grants from the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2025NSCQ-GPX0950) and The National Natural Science Foundation of China (U23A2070).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

LÜ Yong-Gang. Tel: 86-27-59367809, E-mail: yglvbme@163.com

CHEN Guo-Bao. Tel: 86-23-62563190, E-mail: gbchen@cqut.edu.cn

Received: July 15, 2026 Accepted: September 08, 2026

their physicochemical properties, including morphology, mechanical properties, particle size, chemical structure, and degradation properties, were characterized. The effects of these microcapsules with different stiffness on the survival, adhesion, and osteogenic differentiation of MSCs were evaluated. Live/dead staining was used to observe cell survival and distribution in the microcapsules, while alkaline phosphatase (ALP) activity and the expression of osteopontin (OPN) and osteocalcin (OCN) were examined to assess osteogenic differentiation. Immunofluorescence staining was further performed to observe the expression of Yes-associated protein (YAP) and integrin $\beta 1$ under different stiffness conditions. In addition, a rat subcutaneous implantation model was used to evaluate the *in vivo* tissue compatibility of the microcapsules. Histological staining and immunohistochemical analysis were carried out to examine local tissue responses and the expression of osteogenic-related proteins.

Results The results showed that all three groups of microcapsules exhibited regular and uniform morphology and similar particle size, and all groups showed good degradability. Except for the differences in mechanical properties, no obvious differences were found in the other physicochemical properties among the three groups. Live/dead staining indicated that all groups of microcapsules had good cytocompatibility. MSCs in the low-stiffness group were mostly round, whereas cells in the medium- and high-stiffness groups showed more obvious spreading. Higher matrix stiffness was more favorable for MSC adhesion, growth, and survival. ALP staining and quantitative analysis showed that ALP activity increased significantly with increasing matrix stiffness. The expression of the osteogenic-related proteins OPN and OCN also increased with increasing stiffness, and the high-stiffness group showed the strongest positive signals. Immunofluorescence results further indicated that YAP and integrin $\beta 1$ fluorescence signals tended to increase in MSCs with increasing matrix stiffness, suggesting that matrix stiffness may influence MSC osteogenic differentiation through stiffness-related cell adhesion and mechanotransduction. *In vivo* experiments showed that all three groups of microcapsules exhibited good histocompatibility after subcutaneous implantation, although different degrees of degradation and local tissue response were observed. Immunohistochemical analysis showed that the expression levels of OPN and OCN increased with increasing matrix stiffness, and the high-stiffness group exhibited higher expression of these osteogenic-related proteins. **Conclusion** CNF endows SA microcapsules with tunable matrix stiffness. While maintaining good biocompatibility, the high-stiffness microenvironment can effectively promote the adhesion and osteogenic differentiation of MSCs, accompanied by increased ALP activity and enhanced OPN and OCN expression. The increased YAP and integrin $\beta 1$ fluorescence signals in the high-stiffness group further indicate that matrix stiffness is closely related to cellular mechanical responses. These findings provide a three-dimensional cell carrier with potential application value for MSC delivery and bone tissue regeneration based on mechanical microenvironment regulation.

Key words mesenchymal stem cells, microcapsules, matrix stiffness, Yes-associated protein/transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, bone repair

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0384

CSTR: 32369.14.pibb.20260384