

Effects of Mechanical Stimuli on the Cell Proliferation and Collagen Production on the Micropatterned Substrate

Su A Park¹, In Ae Kim¹, Chong-Rak Kim², Ji Won Shin¹, Su Jin Heo¹,
Young Mi Hwang¹, Dong Hwa Kim¹ and Jung-Woog Shin^{1†}

¹Department of Biomedical Engineering, Inje University, Gimhae 621-749, Korea.

²Department of Biomedical Laboratory Science, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

In relation to the tissue engineering, the cellular responses to the morphology of the scaffold surface are interesting topics. Human ligament fibroblasts (HLFs) were cultured on the micropatterned silicone substrates subjected to cyclic stretch to simulate ligament motion. Groove and ridge width of silicone substrates was 10/50, 20/50, 20/10, and 20/20 μm (groove/ridge μm) with a depth of 3 μm . Strain was applied over two days for 4 hours per day with a frequency of 0.5 Hz with the magnitudes of 4 or 8%. The purpose of this study was to evaluate ligament fibroblast alignment and cellular responses in relation to the pattern of microgrooved surface and stretching magnitude. Ligament fibroblasts in the microgrooved surface were elongated and aligned parallel to the microgrooves under no stretch. Uniaxial cyclic stretch induced cellular activities and their orientation rise in cellular response and the cells showed alignment and elongation perpendicular to the direction of the stretch. Biochemical analyses showed that the best cellular response was found on the 20/50 μm under 8% stretch. The surface morphology and mechanical stretching were found to contribute to increase of proliferation, collagen production.

Key Words: Biomechanical condition, Human ligament fibroblasts (HLFs), Micropatterned silicone, Cell proliferation, Collagen production

서 론

현재 연구되어지고 있는 조직 공학을 기초로 한 조직 재생을 위해서는 세포와 지지체 (scaffold), 그리고 적절한 배양 환경 등 3가지 요소가 최적의 상태를 유지하여야 한다. 그 중에서 지지체의 표면 및 구조적 성질, 그리고 배양 환경을 결정하는 많은 인자 중 기계적 자극이 세포의 반응에 많은 영향이 미치는 것으로 보고되고 있다 (Wang et al., 2004; Yang et al., 2004). 또한, 세포는 부착표면의 형태에 따라 이동, 부착, 증식에 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있다 (Atance et al., 2004; Neidlinger-Wilde et al., 2002, 2001; Wang et al., 2005, 2004, 2003, 2000a, b; Yang et al., 2004; Zeichen et al., 2000). 그러나, 기계적 자극의 크기에 따른 변화와 표면의 형태 변화의 영향에 대한 정량적 분석 연구가 국내에서는 미흡한 상황이다.

인체 내 (*in vivo*)의 세포 혹은 조직은 일상생활을 통하여 지속적인 압축 (compression), 인장 (tension), 전단 (shear)과 같은 기계적인 자극을 받고 있으며, 이러한 자극은 인체 내에서 일어나는 다양한 생리학적 변화와 유지에 기여하는 것으로 알려져 있다 (den Braber et al., 1998a, b, c, 1996a, b; Jones et al., 2005; Matsuzaka et al., 1999; Miller et al., 2002; Walboomers et al., 1998). 특히, 인대는 콜라겐 다발들이 한 방향으로 잘 배열된 결합조직으로 되어 있고, 인대 세포는 인대의 교원질 방향으로 잘 정렬되어 끊임없이 기계적인 인장 자극을 받고 있으며 (Wang et al., 2004, 2000b; Yang et al., 2004), 세포외기질 (extracellular matrix)에 단백질을 분비하여 콜라겐을 합성하고 조직을 형성하는 것으로 알려져 있다 (Yang et al., 2004) 또한, 이러한 인장 자극은 세포의 증식과 단백질 합성에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있고 (den Braber et al., 1996b; Jones et al., 2005; Miller et al., 2001; Walboomers et al., 1999), 이러한 기계적인 자극에 대한 다양한 세포의 반응에 대한 연구가 많이 보고되어지고 있다 (den Braber et al., 1998a, b, c, 1996a, b; Jones et al., 2005; Matsuzaka et al., 1999; Miller et al., 2002; Walboomers et al., 1998). 그러나, 기계적 자극이 각 세포나 조직마다 단백질의 합성을 감소시키기도 하고, 증가시키기도 하며, 이에 따른 정확한 기전과 이유는 밝혀지지 않

* 논문 접수: 2006년 3월 17일

수정재접수: 2006년 5월 4일

† 교신저자: 신정욱, (우) 621-749, 경남 김해시 어방동 607번지, 인제대학교 의용공학과

Tel: 055-320-3317, Fax: 055-327-3292

e-mail: sjw@bme.inje.ac.kr

았다 (den Braber et al., 1996b; Jones et al., 2005; Miller et al., 2001; Walboomers et al., 1999). 따라서, 세포에 따라 다양한 표면의 패턴 연구와 동시에 기계적 자극에 대한 연구도 필요하다. 이러한 영향으로 *in vitro* stretching system을 이용하여, 인장 자극을 가하여 인대 세포의 다양한 반응을 연구하고, 최적의 패턴과 자극을 선별하고자 하였다.

따라서, 본 연구는 인대와 유사한 형태학적 표면으로 마이크로 패턴화된 기질을 만든 후 인대 세포를 배양, 분석함에 있어 제어된 기계적 자극을 도입하여 각 인자의 변화에 따른 세포의 다양한 반응을 고찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 마이크로패턴화된 지지체 제작

광마스크를 이용하여 패턴을 제작하였고, 광리소그래피를 통해 패턴되어진 실리콘-웨이퍼를 만들었다. 만들어진 실리콘-웨이퍼는 아세톤 (acetone)과 불산 (HF, hydrofluoric acid)을 처리하여 세정과정을 거치고, 물과 질소가스를 이용하여 이물질을 제거하였다. 인장 자극 실험을 위한 실리콘 (PDMS, polydimethylsiloxane)은 Sylgard 184 Kit (A와 B, Dow Corning, USA)를 사용하였고, A와 B를 10:1 비율로 섞은 후, 실리콘-웨이퍼 위에 부어, spin coater (Karl Suss, RC8, Germany)를 이용하여 용액이 균일하게 퍼지도록 하여 150°C의 핫플레이트 상에서 10분 동안 경화시켰다. 실리콘이 완전히 굳은 후, 실리콘-웨이퍼에서 천천히 떼어내어, SEM (scanning electron microscope)을 이용하여 표면의 간격을 관찰하였다. 패턴 형태는 홈 (groove)의 간격은 10 µm와 20 µm로 하였고, 마루 (ridge)의 간격은 10 µm, 20 µm와 50 µm로 하였으며, 홈 (groove)의 깊이는 3 µm로 하였다. 홈/마루가 각각 10/50, 20/50, 20/10, 20/20 µm이 되어지도록 4 종류로 만들었다. 패턴이 없는 필름 형태의 실리콘을 대조군으로 하였다. 만들어진 실리콘은 3차 증류수로 씻은 후, 오토클레이브하고 자외선으로 멸균하였다. 실리콘은 세포 부착을 높이기 위해, 파이브로넥틴을 이용하여 코팅하였다.

2. 세포 분리 및 배양

세포는 인제대학교 백병원 정형외과에서 슬관절 치환술 (total knee arthroplasty) 시 얻어진 사람의 인대로부터 collagenase 효소를 처리하여 분리하였다. 배지는 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, NC, USA)를 포함한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Gibco BRL, MD, USA)을 사용하였으며, T75 플라스크에서 단층배양하였다. 증식시킨 인대 세포는 트립신으로 회수하여 5.0×10^4 cells/cm² 농도로 실리콘에 접종한 후, 20시간 동안 CO₂ 인큐베이터 내에서 세포 부착을 안정화시켰다.

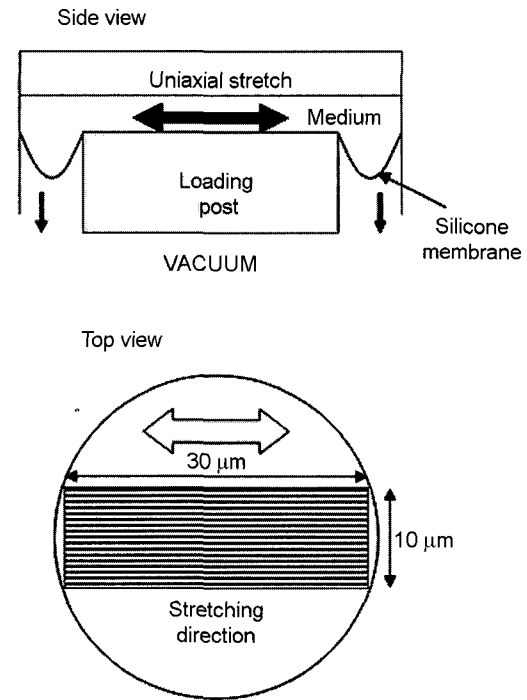


Fig. 1. Stretch of silicone substrate by vacuum. Stretch and groove direction (arrows).

3. 인장 자극

세포에 인장을 가하기 위해 Cell Strain Bioreactor (TS-CSB100, Taesan, Korea)를 이용하였다. 만들어진 실리콘을 6-well plate를 부착하여, vacuum을 이용하여 음압을 걸어 한 방향으로 실리콘을 인장함으로써, 세포에 인장 자극이 가해지도록 하였다. 인장 방향은 홈의 방향과 평행하게 가해지도록 하였다 (Fig. 1). 세포에 가해지는 인장 자극의 크기는 4%와 8%로 하였고, 주기는 0.5 Hz로 하였으며, 하루에 4시간씩 2일간 자극을 가하였다. 자극 후, 각각 3일과 5일에 세포를 수집하였다.

4. 패턴화된 실리콘에서 인장 실험에 의한 인대 세포의 관찰

액틴 염색을 통해 세포 내 골격의 배열을 관찰하기 위해 배양한 세포를 4% paraformaldehyde에 고정하여, PBS로 씻어주고, 0.1% Triton X-100 용액에 넣어 20분 동안 4°C에 두었다가 다시 PBS로 씻어낸다. 블로킹 용액으로 1% BSA를 사용하였으며, PBS로 세척한 후, rhodamine phalloidin을 반응시켜 PBS로 잘 헹구어 마운팅하였다. 형광현미경을 이용하여 세포를 부착시킨 후, 24시간 (인장 자극을 가하지 않음), 48시간 (인장 자극 2회), 72시간 (자극에 의한 형태가 회복되는지 여부 관찰)에 각각 세포 골격의 배열을 관찰하였다.

5. 생화학적 분석

세포의 증식 정도는 Picogreen assay kit (Molecular Probes, P-7581, OR, USA)를 이용하여 5분 동안 반응시킨 후, DNA content를 측정하였다. 세포외기질의 콜라겐 합성 정도는 Sircol collagen assay kit (Biocolor, S1000, UK)를 이용하여 30분 동안 반응시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Total protein content는 protein assay kit (Bio-Rad, 500-0006, CA, USA)를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 protein 양을 계산하였다. 콜라겐 합성 정도는 단백질 content를 이용하여 정량화하였다. 실험군은 마이크로패턴화된 기질의 간격과 인장 자극에 따라 9군으로 나누었고 (Table 1), 실험조건은 다음과 같이 4가지로 나누었다 (Table 2). 실험 1) 패턴의 홈과 인장 자극의 크기에 대한 실험, 실험 2) 마이크로패턴화된 기질의 마루 간격의 영향에 대한 실험, 실험 3) 인장 자극 부과 기간에 대한 실험, 실험 4) 세포 농도의 변화에 대한 실험.

6. 통계학적 분석

실험에서 얻어진 값은 평균 ± 표준편차로 표시하였으며, 각 군간의 다중비교 (multiple comparison)를 위해 SPSS 10.0 (Ver. 10.0, Standard Software Package Inc., USA)을 이용하여 Fisher's LSD 방법으로 처리하였고, 유의 수준은 $P=0.05$ 를 기준으로 통계적 유의 수준 여부를 판단하였다.

결과 및 고찰

일반적으로 세포는 재료의 표면의 형태에 영향을 많이 받

Table 1. Group classification of pattern size and strain magnitude

Pattern (μm) \n Strain (%)	No pattern	10/50 (Groove/Ridge)	20/50 (Groove/Ridge)
0	NP_0	10/50_0	20/50_0
4	NP_4	10/50_4	20/50_4
8	NP_8	10/50_8	20/50_8

Table 2. Experimental methods for biochemical analyses

	Experiment 1)	Experiment 2)	Experiment 3)	Experiment 4)
Stretching magnitude	4 and 8%	8%	8%	8%
Groups of patterns	No pattern, 10/50 μm , 20/50 μm	No pattern, 20/10 μm , 20/20 μm , 20/50 μm	No pattern, 20/20 μm , 20/50 μm	20/50 μm
Stretching days (after seeding)	1 and 2 days	1 and 2 days	1, 2, and 4 days	1, 2, and 4 days
Seeding density	5×10^4 cells/cm ²	5×10^4 cells/cm ²	5×10^4 cells/cm ²	1×10^4 cells/cm ² , 5×10^4 cells/cm ²

고 있으며, 이에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다 (den Braber et al., 1998a, b, c, 1996a, b; Jones et al., 2005; Matsuzaka et al., 1999; Miller et al., 2002; Walboomers et al., 1998). 특히, 표면 형태가 한방향으로 배열된 기질에서는 홈의 방향에 따라 세포가 정렬되었으며, 홈의 방향과 같은 방향으로 인장 자극을 가했을 때도 홈의 방향에 따라 세포가 정렬하는 것으로 알려져 있다 (den Braber et al., 1998a, b, c, 1996a, b; Miller et al., 2001; Walboomers et al., 1999). 세포는 자극에 대해 최소의 영향을 받으려는 성질로 인해, 인장 자극 방향을 피해서 수직으로 반응하여 정렬한다 (Neidlinger-Wilde et al., 2002, 2001; Wang et al., 2000a). 그러나, 마이크로패턴화된 기질을 이용한 인장 자극에 대한 연구는 국외에서도 많지 않고, 국내에서는 이루어지지 않고 있다. 또한, 이러한 마이크로패턴화된 기질과 인장 자극의 반응에 대한 세포의 메카니즘은 아직 정확하게 밝혀지지 않고 있다.

본 연구에서는 광리소그래프로 제작된 마이크로패턴화된 실리콘은 SEM을 통해 균일하고 일정한 패턴의 형태를 확인하였고 (Fig. 2), 실리콘의 두께는 300 μm 이었다.

F-actin 염색 결과, 시간이 지남에 따라 더 많은 세포가 부착되었다 (Fig. 3). 인장 자극을 가하지 않았을 때, 패턴화되지 않은 실리콘에서는 세포가 무작위적으로 배열되어 있었고, 마이크로패턴화된 실리콘에서는 시간이 지날수록 세포가 홈에 대해 평행하게 배열하였으며, 10/50 μm 와 20/50 μm 에서의 차이는 나타나지 않았다. 그러나, 인장 자극을 가하였을 때, 패턴화되지 않은 실리콘에서는 세포가 인장 자극 방향을 피해서 수직 방향으로 배열하려는 경향을 나타냈고, 패턴화된 실리콘에서는 홈의 영향으로 세포가 수직으로 배열하려는 성질의 영향을 덜 받았다. 세포는 홈의 방향에 따라 배열하고 이동하려는 성질을 갖는다. 이러한 현상은 'contact guidance'로 널리 알려져 있으며 (den Braber et al., 1996b, Walboomers et al., 1999), 본 실험을 통해서도 이러한 결과를 확인하였다.

마이크로패턴화된 기질에서 같은 방향으로 인장 자극을 가했을 때, 세포가 홈의 영향으로 정렬한다는 연구도 보고 되어지고 있다 (Jones et al., 2005; Wang J et al., 2004, 2000b;

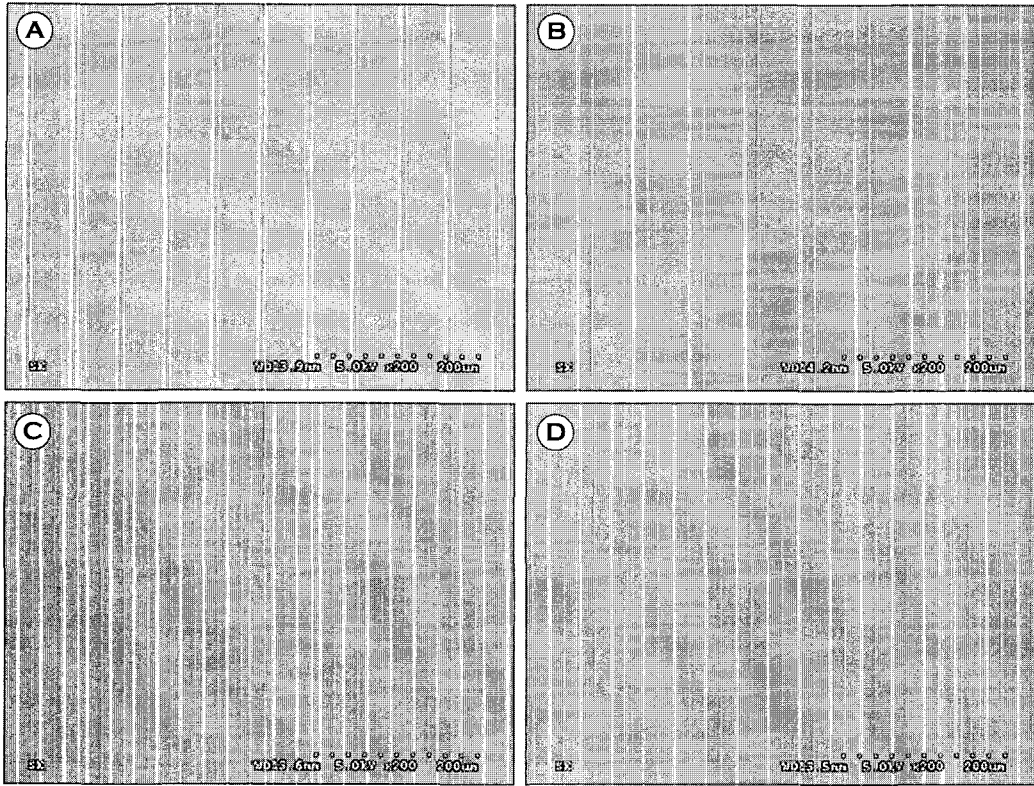


Fig. 2. SEM images of micropatterned silicone: (A) 10/50 μm ; (B) 20/50 μm ; (C) 20/10 μm ; (D) 20/20 μm in groove/ridge widths.

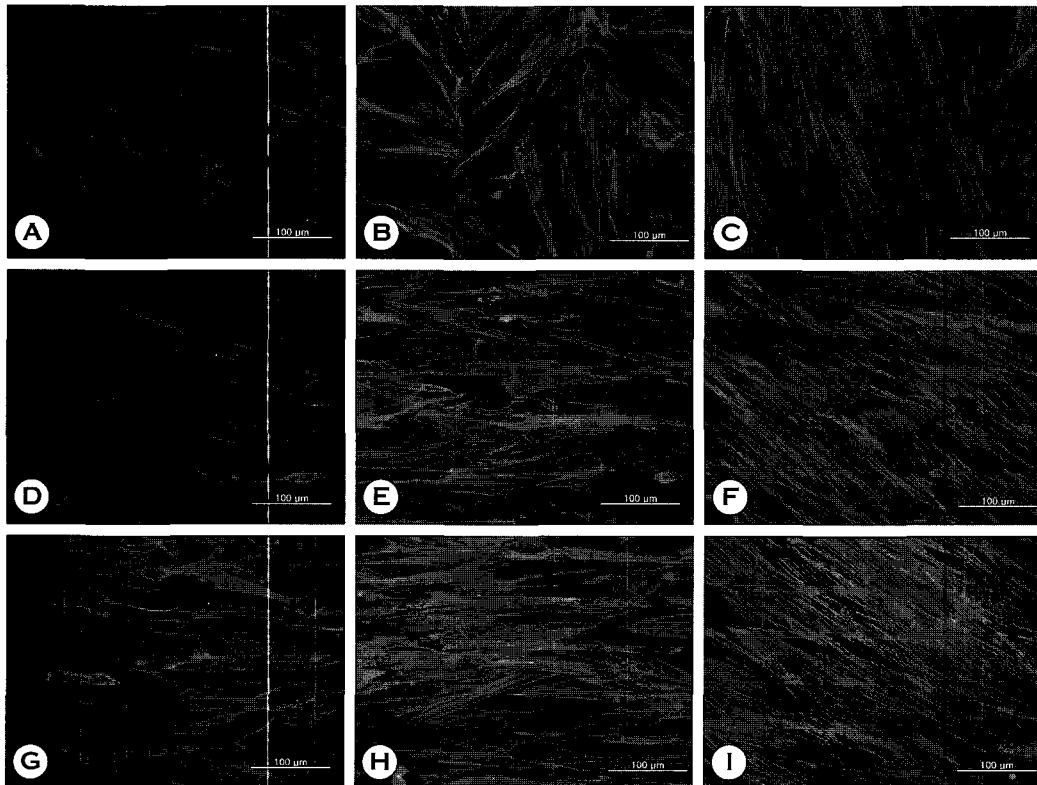


Fig. 3. The organized actin cytoskeleton of the ligament fibroblasts in response to cyclic stretch (8%, 0.5 Hz, 4 hours). (A, B, C): no groove, (D, E, F): 10/50 μm , (G, H, I): 20/50 μm in groove/ridge widths; left: No stretch (24 h), middle: No stretch (48 h), right: Stretch (72 h).

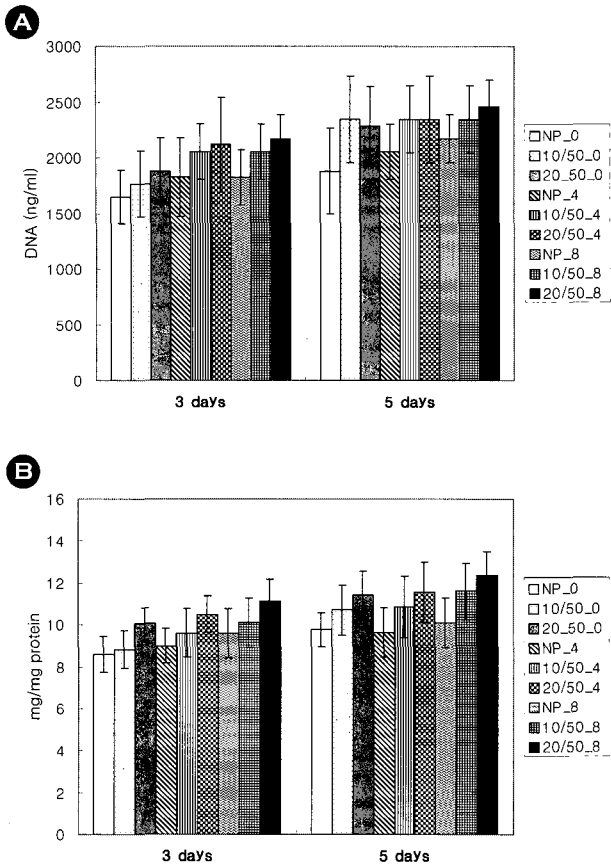


Fig. 4. Biochemical analyses according to groove micropatterns and stretching magnitude: (A) DNA content; (B) collagen production.

Yang et al., 2004). 그러나, 본 연구에서는 인장 힘의 방향으로 평행하게 배열된 것이 아니라 자극을 가하였을 때, 힘에 대해 60° 방향으로 배열하였다. 이것은 패턴의 10/50 μm 와 20/50 μm 의 간격이 넓어 인장 자극에 대해 수직 방향으로 움직일 수 공간이 제공된 것으로 사료되어진다.

많은 연구 결과에서 인장 자극을 이용하여 세포의 증식 및 단백질 합성에 대한 세포의 반응은 증가를 나타내기도 하고, 감소를 나타낸다고 보고하고 있으며 (Atance et al., 2004; Wang et al., 2000b; Yang et al., 2004; Zeichen et al., 2000), 본 연구에서도 이를 확인하였다. 세포의 증식과 단백질 합성에서 10/50 μm 보다는 20/50 μm 에서 넓은 표면에 부착된 세포가 더 영향을 많이 받았을 것으로 사료되어진다.

실험 1) 패턴의 힘과 인장 자극의 크기에 대한 실험 (Fig. 4)

인장 자극을 4%와 8%로 하여 자극 크기의 차이에 대한 세포의 증식과 콜라겐 합성을 알아보려고 하였다. 시간에 따라 증식이나 콜라겐 합성이 증가하였으며, 10/50 μm 패턴보다는 20/50 μm 패턴에서 더 높았다. 그리고, 4% 인장 자극

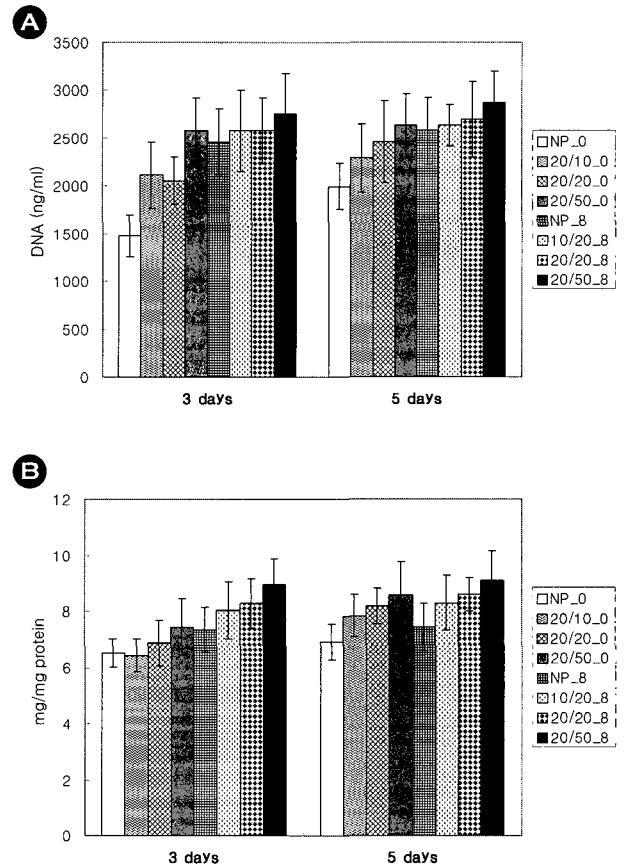


Fig. 5. Biochemical analyses according to ridge micropatterns: (A) DNA content; (B) collagen production.

보다는 8%에서 비교적 높은 값을 나타냈다. 특히, '20/50_8' 실험군은 'NP_0' 실험군보다 유의한 수준으로 세포의 증식 ($P < 0.001$)과 콜라겐 합성 ($P < 0.000$)이 증가하였다. 마이크로패턴화와 인장 자극이 서로 상승 효과로 작용했을 것으로 사료되어진다.

실험 2) 마이크로패턴화된 기질의 마루 간격에 대한 실험 (Fig. 5)

마이크로패턴의 마루의 간격의 크기 차이에 대한 세포의 증식과 콜라겐 합성을 알아보려고 하였다. 마루의 간격을 좁게 한 경우는 20/10 μm , 같게 한 경우는 20/20 μm 로 하였다. 이러한 실험군에 비해 '20/50_8' 실험군이 세포의 증식과 콜라겐 합성 모두 높은 값을 나타냈다. 패턴화되지 않은 실험군보다는 패턴화된 실험군에서, 자극을 가하지 않은 실험군보다는 자극을 가한 실험군에서 보다 더 높은 값을 나타냈다. 또한, '20/50_8' 실험군은 모든 실험군에 비해 유의한 차이를 나타냈다. 세포의 증식이나 콜라겐 합성은 마루보다는 힘의 영향을 더 많이 받는 것으로 보여진다.

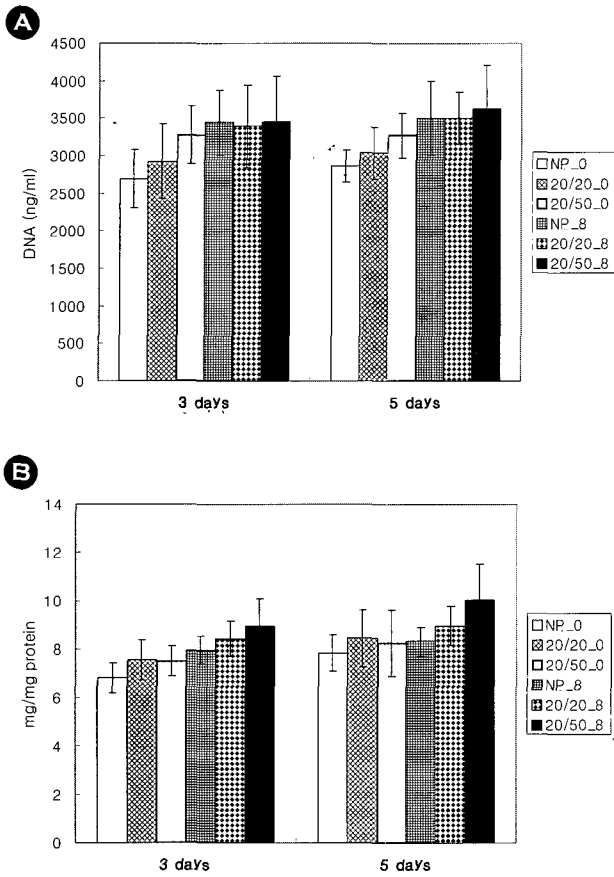


Fig. 6. Biochemical analyses according to stretching days: (A) DNA content; (B) collagen production.

실험 3) 인장 자극의 일수에 대한 실험 (Fig. 6)

세포 접종 후, 1, 2일째 주었던 자극에 4일째 추가로 가한 자극의 세포에 대한 역치 작용을 기대하였다. 5일째 측정 결과, 시간이 지남에 따라 세포의 증식과 콜라겐 합성은 증가하였으나, 자극의 효과로 인한 큰 효과가 나타나지 않았다. 이 실험에서도 '20/50_8' 실험군은 'NP_0' 실험군보다 유의한 수준으로 세포의 증식 ($P < 0.003$)과 콜라겐 합성 ($P < 0.000$)이 증가하였다.

실험 4) 세포 접종 농도에 대한 실험 (Fig. 7)

세포의 포화 상태의 영향을 받는지 고농도와 저농도의 세포 접종 결과, 예상대로 고농도의 세포 농도에서 더 높은 세포의 증식이나 콜라겐 합성을 보였다. 또한, 자극을 가했을 때, 자극을 가하지 않았을 때보다 세포의 증식도 높았고, 콜라겐 합성 정도도 높게 나타났다.

4가지의 실험을 통해 얻은 결과, 마이크로패턴과 인장 자극은 세포의 증식과 콜라겐 합성 정도에 영향을 주었다. 특히, '20/50_8' 실험군이 다른 실험군에 비해 세포의 증식과 콜라겐 합성 정도에 유의한 차이를 나타냈다. 패턴화된 표면

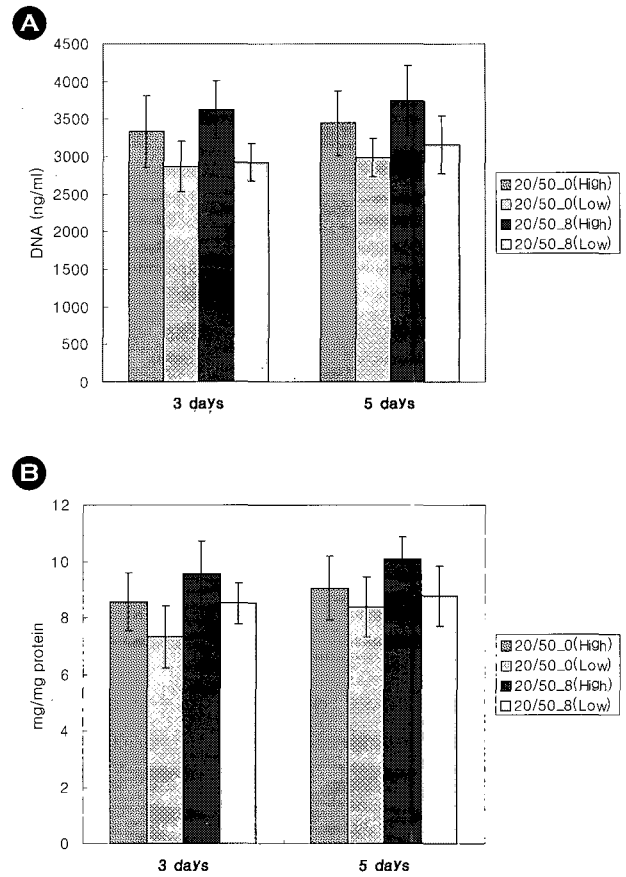


Fig. 7. Biochemical analyses according to seeding density: (A) DNA content; (B) collagen production.

과 인장 자극이 함께 가해졌을 때, 세포 증식과 콜라겐 합성이 우수하였다. 인장 자극으로 인해 세포의 증식이 증가하거나 감소하기도 하고, 단백질 합성이 증가하거나 감소되어지는 보고들이 있지만, 이에 대한 정확한 메커니즘은 밝혀지지 않았다 (Atance et al., 2004; Wang et al., 2000b; Yang et al., 2004; Zeichen et al., 2000). 본 연구에서는, 마이크로패턴은 세포의 형태를 유지하는데 영향을 주고, 더불어 기계적 자극은 세포의 증식 및 단백질 합성에 영향을 주었다고 본다.

결론

마이크로패턴화된 실리콘 표면에서 인대 세포는 인장 자극을 가하지 않았을 때는 패턴을 따라 배열하였고, 인장 자극을 가하였을 때는 자극 방향을 피해서 배열하려는 성질을 나타내었으나, 패턴의 홈과 마루로 인한 영향은 작은 것으로 확인되었다. 그리고, 마이크로패턴화된 실리콘과 인장 자극은 세포의 증식과 단백질 합성에 영향을 주었다. 특히, 마이크로패턴화된 실리콘에서 홈과 마루의 간격이 클수록, 자극의 크기가 클수록 증가하는 경향을 보였다. 그리고, 마이

로 패터닝되지 않은 실리콘에서 인장 자극을 가하지 않았을 때보다 마이크로패터닝된 실리콘에서 인장 자극을 가했을 때 유의하게 증가하였다.

결론적으로 마이크로패터닝된 실리콘 표면과 인장 자극에 대한 연구로 인해 인대의 생체재료를 개발하는데 도움을 주며, 인장 자극이기를 이용하여 다양한 세포에 마이크로패터닝과 인장 자극을 줌으로써 세포가 어떻게 반응하는지를 연구할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2003년도 과학기술부가 주관하는 국책연구개발사업인 주력산업고부가치기술 사업 '소재용 나노파이버 제조기계 기술개발 사업' 과제의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- Atance J, Yost MJ, Carver W. Influence of the extracellular matrix on the regulation of cardiac fibroblast behavior by mechanical stretch. *J Cell Physiol.* 2004. 200: 377-386.
- den Braber ET, de Ruijter JE, Ginsel LA, von Recum AF, Jansen JA. Orientation of ECM protein deposition, fibroblast cytoskeleton, and attachment complex components on silicone microgrooved surfaces. *J Biomed Mater Res.* 1998a. 40: 291-300.
- den Braber ET, Jansen HV, de Boer MJ, Croes HJ, Elwenspoek M, Ginsel LA, Jansen JA. Scanning electron microscopic, transmission electron microscopic, and confocal laser scanning microscopic observation of fibroblasts cultured on microgrooved surfaces of bulk titanium substrata. *J Biomed Mater Res.* 1998b. 40: 425-433.
- den Braber ET, de Ruijter JE, Ginsel LA, von Recum AF, Jansen JA. Quantitative analysis of fibroblast morphology on microgrooved surfaces with various groove and ridge dimensions. *Biomaterials* 1996a. 17: 2037-2044.
- den Braber ET, de Ruijter JE, Smits HTJ, Ginsel LA, von Recum AF, Jansen JA. Quantitative analysis of cell proliferation and orientation on substrata with uniform parallel surface microgrooves. *Biomaterials* 1996b. 17: 1093-1099.
- Jones BF, Wall ME, Carroll RL, Washburn S, Banes AJ. Ligament cells stretch-adapted on a microgrooved substrate increase intercellular communication in response to a mechanical stimulus. *J Biomech.* 2005. 39: 1653-1664.
- Matsuzaka K, Walboomers XF, de Ruijter JE, Jansen JA. The effect of poly-L-lactic acid with parallel surface micro groove on osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* 1999. 20: 1293-1301.
- Miller C, Jefinija S, Mallapragada S. Synergistic effects of physical and chemical guidance cues on neurite alignment and outgrowth on biodegradable polymer substrates. *Tissue Eng.* 2002. 8: 367-378.
- Miller C, Shanks H, Witt A, Rutkowski G, Mallapragada S. Oriented Schwann cell growth on micropatterned biodegradable polymer substrates. *Biomaterials* 2001. 22: 1263-1269.
- Neidlinger-Wilde C, Grood ES, Claes L, Brand R. Fibroblast orientation to stretch begins within three hours. *J Orthop Res.* 2002. 20: 953-956.
- Neidlinger-Wilde C, Grood ES, Wang J, Brand R, Claes L. Cell alignment is induced by cyclic changes in cell length: studies of cells grown in cyclically stretched substrates. *J Orthop Res.* 2001. 19: 286-293.
- Walboomers XF, Croes HJE, Ginsel LA, Jansen LA. Contact guidance of rat fibroblast on various implant materials. *J Biomed Mater Res.* 1999. 47: 204-212.
- Walboomers XF, Croes HJE, Ginsel Jansen JA. Growth behavior of fibroblasts on microgrooved polystyrene. *Biomaterials* 1998. 19: 1861-1868.
- Wang J, Yang G, Li Z. Controlling cell responses to cyclic mechanical stretching. *Annal Biomed Eng.* 2005. 33: 337-342.
- Wang J, Yang G, Li Z, Shen W. Fibroblast response to cyclic mechanical stretching depend on cell orientation to the stretching direction. *Biomaterials* 2004. 37: 573-576.
- Wang J, Jia F, Gilbert TW, Woo SL. Cell orientation determines the alignment of cell-produced collagenous matrix. *J Biomech.* 2003. 36: 97-102.
- Wang J. Substrate deformation determines actin cytoskeleton reorganization: a mathematical modeling and experimental study. *J Theor Biol.* 2000a. 202: 33-41.
- Wang J, Grood ES, Florer J, Wenstrup R. Alignment and proliferation of MC3T3-E1 osteoblasts in microgrooved silicone substrata subjected to cyclic stretching. *Biomaterials* 2000b. 33: 729-735.
- Yang G, Crawford RC, Wang J. Proliferation and collagen production of human patellar tendon fibroblast in response to cyclic uniaxial stretching in serum-free conditions. *Biomaterials* 2004. 37: 1545-1550.
- Zeichen J, van Griensven M, Bosch U. The proliferation response of isolated human tendon fibroblasts to cyclic biaxial mechanical strain. *Am J Sports Med.* 2000. 28: 888-892.