

# 나노기둥구조 크기가 섬유아세포의 증식 및 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)의 발현에 미치는 영향

<sup>1</sup>연세대학교 의과대학 성형외과학교실, <sup>2</sup>강남세브란스병원 성형외과, <sup>3</sup>연세대학교 글로벌융합공학부, <sup>4</sup>연세대학교 글로벌융합기술원  
강은혜<sup>1</sup>, 이상수<sup>1,2</sup>, 윤영식<sup>3,4</sup>, 이원재<sup>1</sup>, 여종석<sup>3,4</sup>, 노태석<sup>1,2</sup>, 윤인식<sup>1,2</sup>

## The influence of nanopillar structure size to fibroblast's proliferation and $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) expression

<sup>1</sup>Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea  
<sup>2</sup>Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Gangnam Severance Hospital, Seoul, Korea  
<sup>3</sup>School of Integrated Technology, Yonsei University, Incheon, Korea  
<sup>4</sup>Yonsei Institute of Convergence Technology, Yonsei University, Incheon, Korea

Eun Hye Kang<sup>1</sup>, Sang Soo Lee<sup>1,2</sup>, Young Sik Yun<sup>3,4</sup>, Won Jai Lee<sup>1</sup>, Jong Souk Yeo<sup>3,4</sup>, Tai Suk Roh<sup>1,2</sup>, In Sik Yun<sup>1,2</sup>

### 교신저자 In Sik Yun

논문 접수일 : 2020년 8월 28일  
논문 완료일 : 2020년 10월 2일  
주소 : Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Gangnam Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, 211 Eonju-ro, Gangnam-gu, Seoul, Korea  
Tel : +82-2-2019-3423  
Fax : +82-2-2019-4881  
E-mail : eqatom@yuhs.ac

**Background** : With advances in medicine and materials engineering, biomaterials, such as silicone and titanium are used in many tissue regeneration cases. Many studies are being conducted to confirm the reactivity of cells to various biomaterials. Among these studies, fibroblast proliferation and differentiation are known as important factors related to capsulation. In this study, we attempted to determine how various sized polyurethane acrylate (PUA) nanopillar structures act on fibroblast proliferation and differentiation.

**Methods** : The scaffolds were prepared in four groups: flat and nanopillar (350 nm, 500 nm, 1,000 nm). Flat group was used as a control. To evaluate the effect of scaffolds of nanopillar structures on fibroblasts, quantitatively analyzed for the degree of adhesion, proliferation and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) expression of cells.

**Results** : As a result of the MTT assay, the proliferation was lower than that of the flat group in the nanopillar group. As a result of staining, the intensity of F-actin was significantly different from that of the flat group. And the intensity of  $\alpha$ -SMA was different from that of the flat group but not significantly.

**Conclusions** : The nanopillar structure of PUA material seems to play a role in inhibiting the proliferation and differentiation of fibroblasts regardless of the size of the structure. This suggests that the use of PUA nanopillar implants may be effective in suppressing fibrosis due to fibroblast proliferation and differentiation.

**Key Words** Nanopillar, Fibroblast, Cell attachment, Cell proliferation

## ■ INTRODUCTION

의료기술의 발달과 삶의 질을 높이는 데에 관심이 증가함에 따라 자가조직을 대체하는 안정적인고 효율적인 의료용 이식재의 수요가 증가하고 있으며 생체적합성이 뛰어난 재료들이 연구 및 사용되고 있다.[1-3] 이렇게 이식된 이식재가 조직의 세포와 접촉할 때, 심한 염증이 발생할 수도 있고 세포의 부착 과다 또는 다른 세포로의 분화가 일어나게 되면 fibrous encapsulation (이하 fibrosis) 같은 부작용이 나타나게 된다.[2-4] Fibrosis가 발생하면 통증, 이식 부위의 외관변형 등이 함께 동반되기[5,6] 때문에 이식 후 fibrosis의 발생을 줄일 수 있도록 하는 것이 임상적으로 중요한 사항이다.

Fibrosis의 아직 명확한 원인은 밝혀져 있지 않으나 알려진 발생 기전을 보면 임플란트 이식 후, 초기에는 leukocyte의 영향이 크지만 후기에는 섬유아세포의 부착 및 증식, 분화가 큰 영향을 미친다.[7]

Fibrosis에서도 중요한 부분인 세포와 이식된 재료 간의 상호작용이 어떻게 일어나는지를 확인하기 위해 섬유아세포, 골아세포, 염증세포 등 다양한 세포들로 연구가 진행되고 있으며,[2,8,9] 이러한 세포와 이식재의 상호작용으로 발생한 fibrosis는 이식재의 이식 부위와 관계없이 나타나기 때문에 이를 억제하기 위한 다양한 임상분야에서 선행 연구들이 있다. 관련 연구 중에서도 본 연구와 같이 섬유아세포와 생체재료의 형태 및 성질을 조절한 연구들이 있다.[9-13]

선행되는 연구들에서는 polydimethylsiloxane (PDMS), polycaprolactone 등 주로 polymer를 이식재로 사용하고 있고, 이식재 표면의 roughness 정도와 코팅물질의 변화를 이용하여 섬유아세포의 부착 및 증식정도를 확인하고 있다.[2,8,9] Roughness를 변화시킨 scaffold에서 크기에 따라 섬유아세포의 배양 시 밀도 및 분화에 차이를 보이며, 섬유아세포의 밀도가 작을 경우 분화가 더 잘 일어난다.[9,14] 또한 세포의 부착과 관련된 것 외에도 세포의 모양과 운동성, 자라는 방향에도 scaffold가 영향을 미치기도 한다.[15,16]

이식재 중에서도 polyurethane acrylate (PUA)는 세포에 toxicity하지 않고 다른 scaffold 소재에 비해 flexible하며 transparent한 성질로 mold를 이용한 나노구조를 만들기 쉽기 때문에 scaffold 제작에 많이 사용되고 있다.[17,18] 이렇게 다양한 재질의 이식재의 표면에 제작된 마이크로 및 나노구조로 연구들이 진행되고 있으나 PUA 재질로 간격이 일정한 나노기둥구조의 scaffold를 제작하고 기둥구조의 크기를 1,000 nm 이하로 다양하

게 하여 섬유아세포의 반응을 연구한 사례는 없다. 그렇기 때문에 본 연구에서 PUA scaffold를 이용하여 제작에 사용하였다. 그래서 본 실험에서는 섬유아세포의 영향이 큰 후기 단계에 초점을 맞추어 실험을 진행하고자 하였다.

이에 PUA 소재로 제작된 나노기둥구조의 크기에 따라 섬유아세포가 나노기둥구조 위에 배양되면서 부착, 증식, alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)의 발현정도가 어떻게 변화하는지 확인하고자 하였다.

## ■ METHODS

### 1. 나노기둥구조(nanopillar) mold 및 scaffold 제작

PUA로 이루어진 나노기둥구조를 만들기 위해 연속적으로 2번의 capillary force lithography [19,20]를 진행하였다(Fig. 1). 샘플 제작의 자세한 내용은 다음과 같다. 제작된 mold의 중심에 일정량의 PUA precursor의 용액을 떨어뜨린 후 glass coverslip으로 덮어주었다. 이때, 용액이 mold와 coverslip 사이의 공간을 기포 없이 완전하게 채운 것을 확인한 뒤 샘플을 자외선(ultra violet [UV] 300 mJ/cm<sup>2</sup>)하에서 경화시켰다. 경화된 샘플 가장자리에 남아있는 여분의 PUA precursor를 isopropyl alcohol (Samchun Chemicals Co., Ltd, Seoul, Korea)을 이용하여 씻어낸 후, 샘플을 mold로부터 매우 조심스럽게 분리하였다(Fig. 1B).

실험그룹은 나노구조가 없는 flat, nanopillar-patterned (350 nm, 500 nm, 1,000 nm) scaffold의 4그룹이며, 각 분석방법에 맞는 크기로 샘플을 준비하였다.

완전히 경화된 나노기둥구조 PUA film은 세포증식 실험용으로 12 well에 PDMS (SYLGARD 184, Dow Corning Co., Midland County, MI, USA)를 이용하여 고정하였다. PDMS는 세포의 부착이 거의 일어나지 않는다고 알려져[21] 있기 때문에 샘플 외에 세포 배양 플레이트의 바닥에 세포가 부착되는 것을 방지하기 위해 사용하였다. 염색 및 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM) 실험용 샘플은 preparation 과정에서 샘플을 이동시켜야 하기 때문에 고정하지 않고 24 well에 준비했다. 이후 플레이트와 샘플을 phosphate-buffered saline (PBS) 및 70% 알코올로 세척 및 UV하에서 멸균을 진행하였다.

### 2. 세포 배양

세포 배양 전, 멸균한 샘플을 PBS 및 세포 배양 배지로 다시 한 번 세척하였다. 실험에 사용되는 세포는 Human Dermal

Fibroblast (ATCC, Manassas, VA, USA)를 사용하였다. 세포는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (Thermo Scientific,

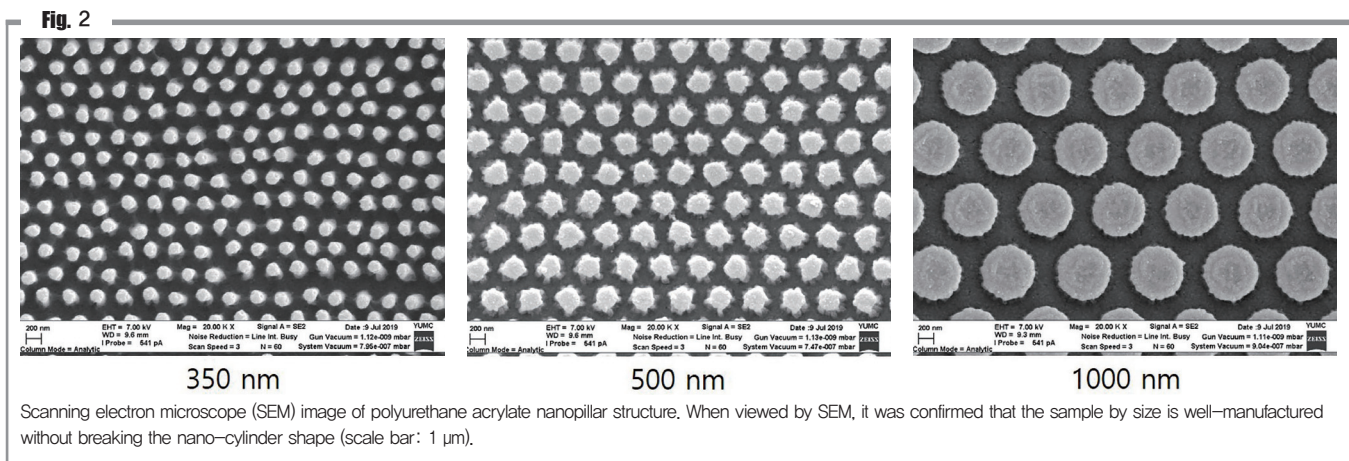
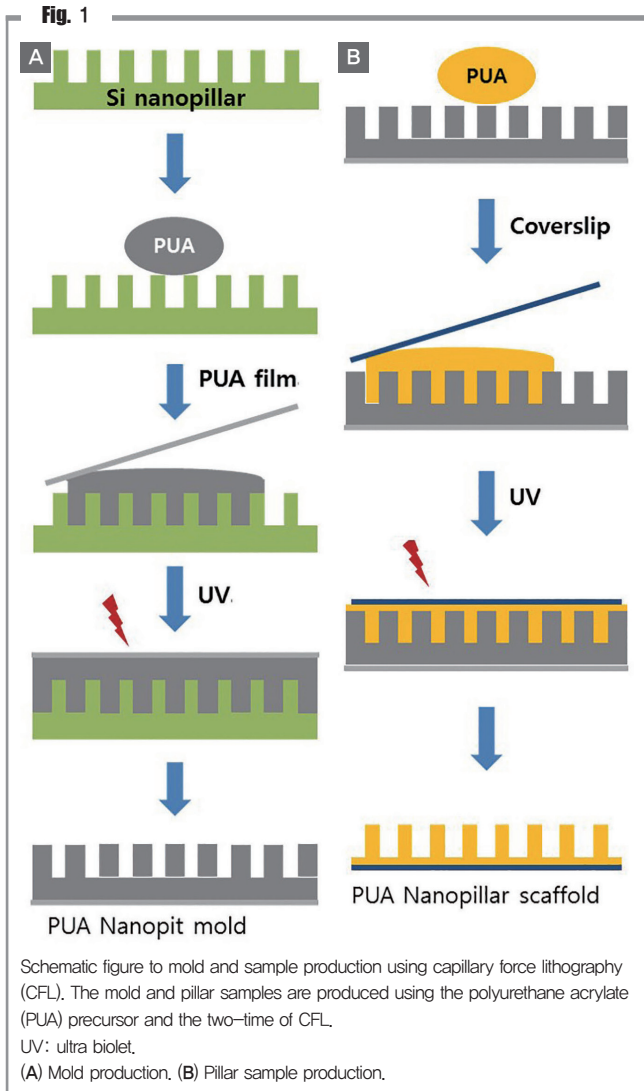
Waltham, MA, USA)에 supplement로 10% fetal bovine serum (Thermo Scientific), 1% penicilin and streptomycin (Thermo Scientific)을 사용하여 배양하였다. 이후 실험에 필요한 정도의 세포수가 되면 자란 세포를 harvest하고 세포 계수를 진행하였다. 세포 계수 후, 실험유형별 다른 크기의 배양 플레이트에  $4 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>로 일정하게 seeding한다.

세포 seeding 후 24시간에 부착된 세포를 제외한 나머지 세포를 제거하기 위해 세포 배양 배지를 교체해 주었다. MTT assay 및 형광염색 등의 실험을 진행하기 전까지 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 incubation하며 배지를 2-3일 간격으로 교체해주었다. 세포가 각 샘플에서 증식 후에 어떤 형태를 나타내는지 확인하기 위해 광학현미경으로 관찰하였다.

### 3. 세포 부착 및 증식분석

세포의 부착 및 증식정도 확인을 위해 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 진행하였다. 부착정도는 세포배양 후 24시간에, 증식정도는 7일에 확인하였다.

MTT assay는 세포배양 배지를 제거 및 세척을 하고 MTT reagent (500 μg/mL; VWR, Radnor, PA, USA)를 처리하였다. Plate는 빛을 차단한 상태에서 37°C에서 3시간 incubation 하였다. Incubation 3시간 후, reagent를 제거하고 dimethyl sulfoxide solution (DMSO, Sigma, St. Louis, MO, USA) 처리하여 formazan crystal을 용해시킨다. 96 well plate로 formazan이 용해된 DMSO를 옮겨 담아 microplate reader (VersaMax™; Molecular Devices, San Jose, CA, USA)에서 570 nm 파장으로 read하고 optical density (O.D)값을 확인하였다.



#### 4. 세포 형광염색

부착된 세포에서  $\alpha$ -SMA 및 F-actin의 차이와 세포형태를 관찰하기 위해 세포가 배양된 후, 형광염색을 통하여 결과를 확인한다.

형광염색의 진행은 먼저 세포를 4% paraformaldehyde로 고정 후,  $\alpha$ -SMA (Abcam, Cambridge, MA, USA), alexafluor 633-phalloidine (Thermo Scientific), alexafluor 488 (Abcam) 항체를 사용하여 염색하였다. DAPI가 포함된 mounting 용액 (Vector Lab Inc., Burlingame, CA, USA)으로 mounting하고 제작이 완료된 샘플은 confocal microscope (LSM700; Carl Zeiss,

Oberkochen, Germany)를 이용하여 염색사진을 촬영하고, 핵의 개수에 따른 intensity를 image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) 프로그램으로 분석하였다.

#### 5. 통계분석

모든 정량적 결과값은 평균과 표준오차로 표기하였고, 통계프로그램은 Graphpad Prism5 (Graphpad software, San Diego, CA, USA)를 이용하였다. 통계적 유의성은 One-way ANOVA (analysis of variance)로 검정하였으며,  $P$ -value가 0.05보다 작을 경우 유의성이 있다고 보았다( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ).

Fig. 3

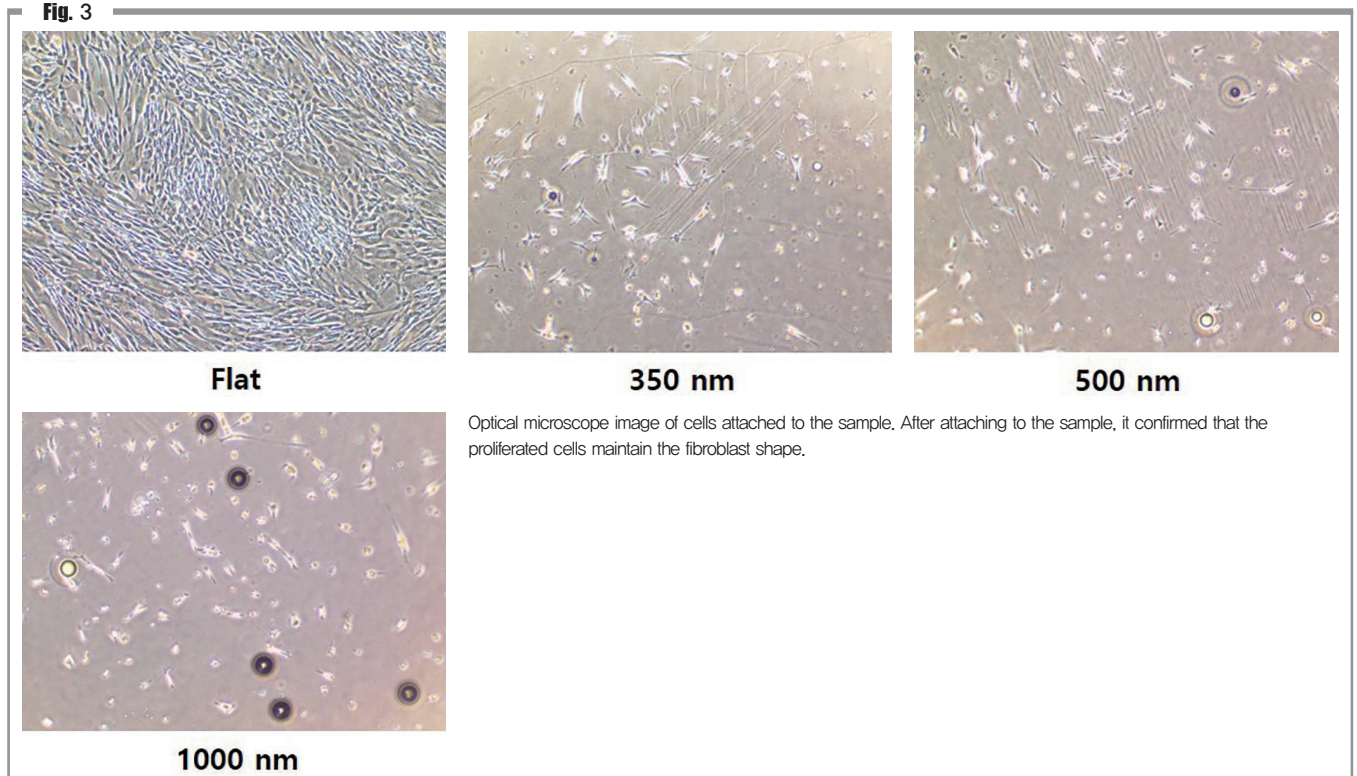
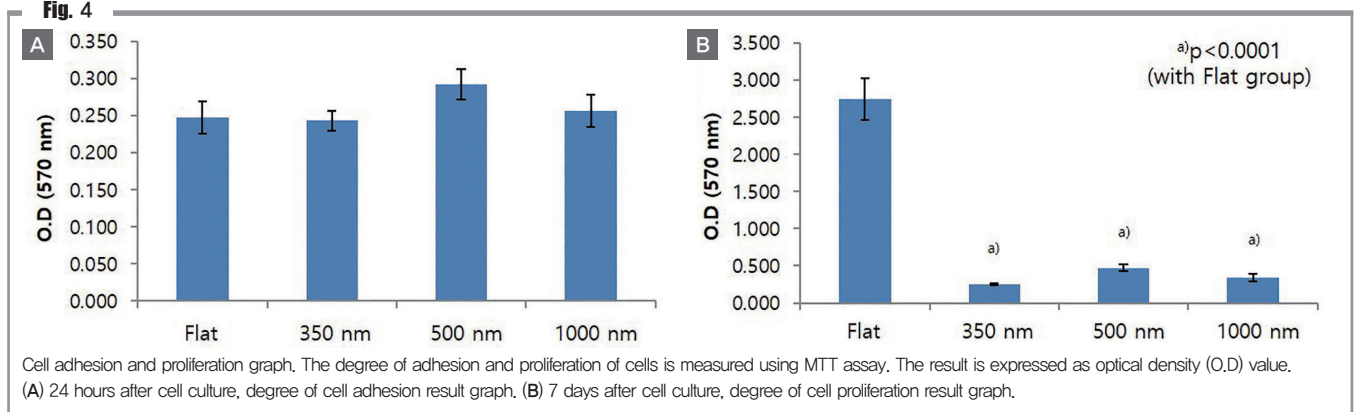


Fig. 4



## RESULTS

### 1. 나노기둥구조 샘플 확인

Mold를 이용한 샘플제작은 샘플의 크기가 일정하게 잘 나오며 [22] 하나의 mold를 재사용하여 여러 개의 샘플을 제작할 수 있다는 장점이 있는 대신 mold에서 샘플을 떼어낼 때, 샘플의 구조가 망가지거나 일부만 떨어질 수 있다. 그렇기 때문에 완성된 샘플을 SEM을 이용하여 관찰하였다. 샘플을 mold에서 떼어낸 뒤에도 나노기둥구조가 크기별로 원기둥 모양이 무너지지 않은 것을 SEM을 통해 확인하였다. 그리고 기둥구조 간에 간격도 잘 유지하고 있는 모습을 볼 수 있었다(Fig. 2).

### 2. 배양된 세포의 형태 관찰

세포배양 시에 세포의 상태가 좋아지지 않거나 분화가 일어나게 되면 세포의 모양이 변화를 보이게 된다. 본 실험에서 샘플 위에 배양된 세포의 모양을 광학현미경으로 관찰한 결과, 샘플에서 세포가

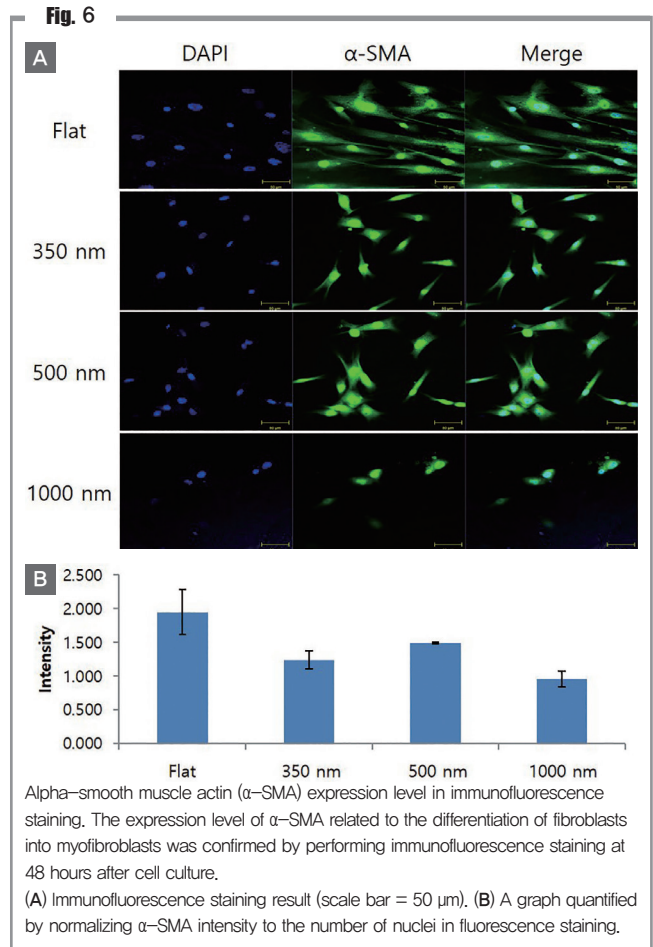
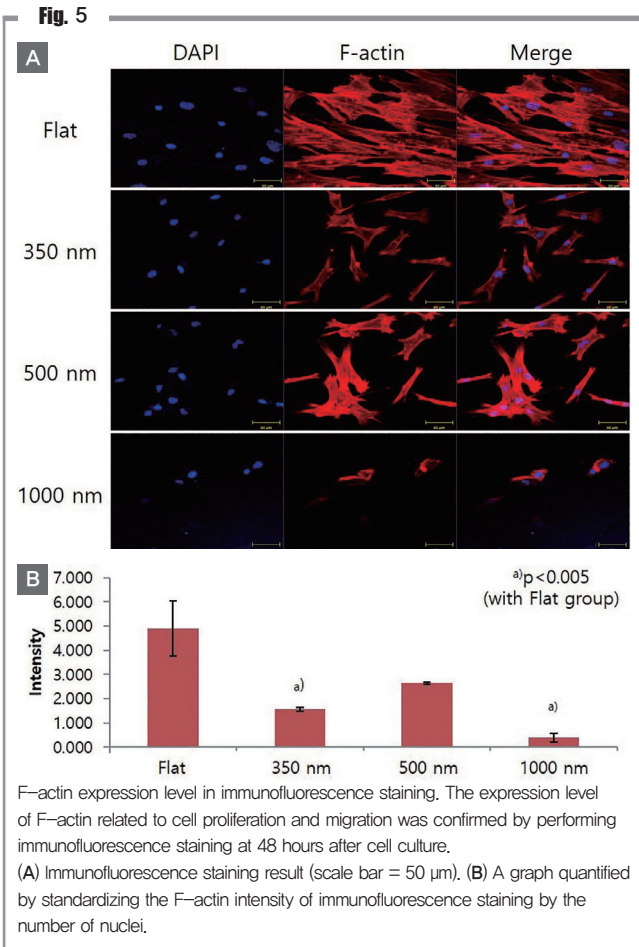
증식되는 양과는 무관하게 각 군별로 세포의 모양이 섬유아세포 형태 그대로 잘 유지되고 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

### 3. 세포의 부착 및 증식정도

세포가 샘플과 접촉하여 잘 생착하고 자라나가는지를 확인하기 위해 MTT assay를 진행하였다. 세포의 부착단계에서는 O.D값이 0.247, 0.243, 0.292, 0.257로 각 군들 간에 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 4A). 세포의 증식정도는 세포배양 후, 7일째에 나노기둥구조군이 flat군에 비해서 증식이 덜 되는 결과를 보였다(Fig. 4B). 증식정도가 통계적으로 flat군과 나노기둥구조군 사이에 유의한 차이를 나타내었다.

### 4. 세포의 분화 및 증식관련 단백질 intensity 확인

세포 배양 3일 후, 형광염색을 진행하여 세포내 분화 및 증식과 관련된 단백질의 변화를 400 배율로 확인하였다. 그 결과, 세포의 증식 및 이동과 관련 단백질인 F-actin의 intensity는 나노기둥구



조군 중 350 nm, 1,000 nm에서 flat군에 비해 통계적으로 유의하게 적게 나타나는 것을 보였다(Fig. 5).

Flat군과 나노기둥구조군을 비교했을 때, 근섬유세포의 표지자로 볼 수 있는  $\alpha$ -SMA는 유의하지는 않았으나 나노기둥구조군에서 flat군에 비해 적게 나타나는 경향이 있었다(Fig. 6).

## DISCUSSION

Fibrosis는 다양한 생체재료의 이식과 관련하여 재료공학과 의료 분야에서 중요한 부분이다.[2,17] 인체에 생체재료가 이식이 되면 세포와 주변 세포외기질(extracellular matrix)로부터 다양한 반응이 발생하는데 이때 부작용으로 발생하는 것이 fibrosis이다.[2,23] Fibrosis의 발생에는 여러 가지 요인이 있는데 섬유아세포의 부착, 증식 및 분화도 그 중 하나이다.[7,23] 이러한 이식재료와 세포의 반응을 개선하기 위한 다양한 생체재료가 개발되고 있다. 재료공학 기술의 발달로 생체재료는 단순히 재료만 바뀌는 것이 아니라 다양한 표면 성질 및 구조를 가지게 되었고 이를 제작하기 위한 다양한 방법들이 사용되고 있다.[18,24-26] 이러한 방법들 가운데 본 연구에서 Quartz 나노구조를 직접 사용하지 않고 mold를 이용한 이유는 세포실험의 반복성 및 재현성을 위해서 다수의 샘플을 만들 필요가 있기 때문이다.

본 실험의 MIT assay 결과, 섬유아세포의 초기 부착 시에는 유의미한 차이가 없었지만 세포의 증식에서는 차이가 있음을 보였다. 타 연구들에서 생체재료 및 다양한 크기 및 형태의 미세구조를 이용하여 실험했을 때, 섬유아세포의 증식이 약해지는 결과[27,28]를 보이는데 이를 볼 때 본 실험의 나노기둥구조도 동일한 효과를 보인다고 생각된다.

$\alpha$ -SMA의 발현은 근섬유세포에서 나타나는 특징 중 하나이다.[9,12,14] 본 연구의 형광염색 결과  $\alpha$ -SMA intensity에서는 나노기둥구조군에서 적게 나타났지만 유의하지는 않았다. 그러나 세포 내 골격을 유지 및 증식, 이동에 관여하는 단백질인 F-actin intensity는 나노기둥구조군에서 유의하게 적게 나타나는 결과를 보였다. 기존의 연구들에서도 F-actin의 발현이 증가할수록 증식이 증가한다는 결과를 확인할 수 있다.[29-31] 이를 통해 나노기둥구조가 섬유아세포의 근섬유세포로의 분화에는 약간의 영향을 미치고 섬유아세포의 증식 억제에 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있다.

MIT assay 결과와 형광염색의 결과를 종합하여 보았을 때, 나노기둥구조군이 섬유아세포의 증식의 감소에 큰 효과를 보이는 것으로 보이며, 근섬유세포로의 분화를 덜 일어나게 하는 것에도 약

간의 효과를 보인다고 생각된다. 이러한 결과는 PUA 소재로 나노기둥구조를 만들면 flat에 비해 세포가 부착 후, stable adhesion과 spreading 시 안정적으로 닿아 있을 수 있는 면적이 제한되어 발생하는 것으로 생각된다. 이후 본 결론을 검토하기 위한 추가적인 실험을 통해 PUA 나노기둥구조의 작용원리의 분석이 필요할 것으로 보인다.

결론적으로 보면 PUA 재질의 나노기둥구조 scaffold는 크기와 상관없이 섬유아세포의 증식, 분화를 억제하는 역할을 하는 것으로 보인다. 이는 PUA 재질의 나노기둥구조로 된 이식재를 사용하면 섬유아세포의 증식, 분화로 인한 fibrosis를 억제하는 데에 효과가 있을 수 있음을 보여준다.

본 연구에서는 섬유아세포에 의한 fibrosis에 초점을 두었지만 이후, macrophage 등의 leukocyte와 함께 fibrosis의 여러 가지 원인을 복합적으로 적용한 추가 실험을 진행하면 fibrosis의 근본적인 해결책에 더 다가갈 수 있을 것이다. 또한 본 연구를 토대로 콜라겐 시트 등 드레싱 제재로 이용하는 생체재료로 상처치유 및 흉터예방과 같은 임상적 상황에 대해서도 섬유아세포의 변화에 대한 추가적인 연구를 진행할 수 있는 근거가 될 수 있을 것으로 생각한다.

## CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a faculty research grant of Yonsei University College of Medicine (6-2018-0104).

## REFERENCES

1. Barr S, Bayat A. Breast implant surface development: Perspectives on development and manufacture. *Aesthet Surg J* 2011;31:56-67.
2. Park C, Lee SW, Kim J, Song EH, Jung HD, Park JU, et al. Reduced fibrous capsule formation at nano-engineered silicone surfaces via tantalum ion implantation. *Biomater Sci* 2019;7:2907-19.
3. Sarker B, Singh R, Silva R, Roether JA, Kaschta J, Detsch R, et al. Evaluation of fibroblasts adhesion and proliferation on alginate-gelatin crosslinked hydrogel. *PLoS One* 2014;9:e107952.
4. Lechner J, Noubissi S, von Baehr V. Titanium implants and silent inflammation in jawbone—a critical interplay of dissolved titanium particles and cytokines TNF- $\alpha$  and RANTES/CCL5 on overall health? *EPMA J* 2018;9:331-43.

5. Coskun E, Szer T, Topuz O, Zencir M, Pakdemirli E, Tahta K. Relationships between epidural fibrosis, pain, disability, and psychological factors after lumbar disc surgery. *Eur Spine J* 2000;9:218–23.
6. Prantl L, Schreml S, Fichtner–Feigl S, Pppl N, Eisenmann–Klein M, Schwarze H, et al. Clinical and morphological conditions in capsular contracture formed around silicone breast implants. *Plast Reconstr Surg* 2007;120:275–84.
7. Barr S, Hill EW, Bayat A. Functional biocompatibility testing of silicone breast implants and a novel classification system based on surface roughness. *J Mech Behav Biomed Mater* 2017;75:75–81.
8. Cohen A, Liu–Synder P, Storey D, Webster TJ. Decreased fibroblast and increased osteoblast functions on ionic plasma deposited nanostructured Ti coatings. *Nanoscale Res Lett* 2007;2:385–90.
9. Majd H, Scherer SS, Boo S, Ramondetti S, Cambridge E, Raffoul W, et al. Novel micropatterns mechanically control fibrotic reactions at the surface of silicone implants. *Biomaterials* 2015;54:136–47.
10. Tamada Y, Ikada Y. Fibroblast growth on polymer surfaces and biosynthesis of collagen. *J Biomed Mater Res* 1994;28:783–9.
11. Stanton MM, Rankenberg JM, Park BW, McGimpsey WG, Malcuit C, Lambert CR. Cell behavior on surface modified polydimethylsiloxane (PDMS). *Macromol Biosci* 2014;14:953–64.
12. Yoo BY, Kim BH, Lee JS, Shin BH, Kwon H, Koh WG, et al. Dual surface modification of PDMS–based silicone implants to suppress capsular contracture. *Acta Biomater* 2018;76:56–70.
13. Valencia–Lazcano AA, Alonso–Rasgado T, Bayat A. Characterisation of breast implant surfaces and correlation with fibroblast adhesion. *J Mech Behav Biomed Mater* 2013;21:133–48.
14. Masur SK, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg I, Petridou S. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:4219–23.
15. Beckwith KS, Ullmann S, Vinje J, Sikorski P. Influence of nanopillar arrays on fibroblast motility, adhesion, and migration mechanisms. *Small* 2019;15:e1902514.
16. Dalby MJ, Riehle MO, Sutherland DS, Agheli H, Curtis AS. Changes in fibroblast morphology in response to nano–columns produced by colloidal lithography. *Biomaterials* 2004;25:5415–22.
17. Kim HN, Kang DH, Kim MS, Jiao A, Kim DH, Suh KY. Patterning methods for polymers in cell and tissue engineering. *Ann Biomed Eng* 2012;40:1339–55.
18. Kim YS, Lee HH, Hammond PT. High density nanostructure transfer in soft molding using polyurethane acrylate molds and polyelectrolyte multilayers. *Nanotechnology* 2003;14:1140–4.
19. Khang DY, Lee HH. Pressure–assisted capillary force lithography. *Adv Mater* 2004;16:176–9.
20. Suh KY, Jeong HE, Park JW, Lee SH, Kim JK. Fabrication of high aspect ratio nanostructures using capillary force lithography. *Korean J Chem Eng* 2006;23:678–82.
21. Wang L, Sun B, Ziemer KS, Barabino GA, Carrier RL. Chemical and physical modifications to poly(dimethylsiloxane) surfaces affect adhesion of Caco–2 cells. *J Biomed Mater Res A* 2010;93:1260–71.
22. Kim JH, Bae WG, Lim KT, Jang KJ, Oh SJ, Jang KJ, et al. Density of nanopatterned surfaces for designing bone tissue engineering scaffolds. *Mater Lett* 2014;130:227–31.
23. Kendall RT, Feghali–Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: Novel roles and mediators. *Front Pharmacol* 2014;5:123.
24. Gadegaard N, Martinez E, Riehle MO, Seunarine K, Wilkinson CDW. Applications of nano–patterning to tissue engineering. *Microelectron Eng* 2006;83:1577–81.
25. Wang M, Lu Y. Nano patterned PDMS for periodontal ligament fibroblast culture. *Surf Coat Technol* 2009;204:525–30.
26. Vladkova TG. Surface engineered polymeric biomaterials with improved biocontact properties. *Int J Polym Sci* 2010;2010:1–22.
27. Chung IC, Li CW, Wang GJ. The influence of different nanostructured scaffolds on fibroblast growth. *Sci Technol Adv Mater* 2013;14:044401.
28. Sunami H, Yokota I, Igarashi Y. Influence of the pattern size of micropatterned scaffolds on cell morphology, proliferation, migration and F–actin expression. *Biomater Sci* 2014;2:399–409.
29. Yun SP, Ryu JM, Jang MW, Han HJ. Interaction of profilin–1 and F–actin via a  $\beta$ –arrestin–1/JNK signaling pathway involved in prostaglandin E(2)–induced human mesenchymal stem cells migration and proliferation. *J Cell Physiol* 2011;226:559–71.
30. Roy M, Kung HJ, Ghosh PM. Statins and prostate cancer: Role of cholesterol inhibition vs. prevention of small GTP–binding proteins. *Am J Cancer Res* 2011;1:542–61.
31. Nishioka T, Arima N, Kano K, Hama K, Itai E, Yukiura H, et al. ATX–LPA1 axis contributes to proliferation of chondrocytes by regulating fibronectin assembly leading to proper cartilage formation. *Sci Rep* 2016;6:23433.