生物医学工程学杂志
J Biomed Eng 2002; 19(3): 370～373

MC3T3-E1 成骨细胞在微格式化表面的黏附

应佩青　靳　刚　陶祖莱
(中科院力学研究所 国家微重力室, 北京　100080)

摘要　细胞在材料表面的黏附对细胞的增殖和分化起重要作用。格式化表面提供了对细胞在基底的空间分布和黏附进行控制的方法。本文利用微制作形成的格式模板, 分别以微接触转印法和微流道法形成格式化表面, 使MC3T3-E1 成骨细胞以一定的格式黏附于表面上。在微接触转印法形成的含二氯二甲基硅烷(DMS)的疏水区域和不含DMS 的亲水区域相间隔的表面, 细胞优先在亲水区域黏附。在微流道法形成的胶原和白蛋白格式化表面, 细胞优先黏附于含胶原区域。结果还表明微格式化表面可以用于研究表面的物理化学性质对细胞的黏附等功能的影响。

关键词　细胞黏附　微接触转印　微流道

MC3T3-E1 Osteoblasts Adhesion to Micropatterned Surfaces

Ying Peiqing　Jin Gang　Tao Zulai
(National Microgravity Lab, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing　100080)

Abstract　Cell adhesion to material surface plays an important role in regulating cell function such as proliferation and differentiation. Surface patterning provides a useful method to control cell spatial distribution and adhesion to substance. Here microcontact printing and microfluidic channels were introduced to pattern MC3T3-E1 osteoblasts on silicon substance. Dichlordimethylsilane (DMS) was used in microcontact printing to generate the alternating domains of DMS and non-DMS, and cells preferentially adhered to the non-DMS and hydrophilic region. On the patterned surfaces generated from collagen and albumin solutions with microfluidic channels, cells preferentially localized in the collagen-coated region. The results also showed that micropatterning could be a useful method to study the effect of surface chemistry on cell adhesion and other functions.

Key words　Cell adhesion　Microcontact printing　Microfluidic channels

1　引　言

细胞在材料表面的黏附或细胞-细胞间的黏附, 其作用不仅仅是将细胞与表面或细胞间黏在一起, 而且提供调节细胞一系列不同功能(如细胞增殖、基因表达、分化、凋亡和迁移)的生化和物理信号[1]。因此研究细胞在材料表面的黏附和材料表面的性质对细胞黏附的影响并控制细胞的黏附是生物医学工程和组织工程等领域的重要问题。微格式化表面可以从分子水平对表面的物理化学性质进行控制, 为研究细胞黏附以及材料的表面性质与细胞黏附之间的关系提供了很好的方法。微格式化表面的制作通常采用光刻法[2,3], 其具体步骤是: 先将光刻胶均匀涂覆在玻璃或其它材料表面, 紫外线透过光掩模对涂层进行局部照射后, 用溶剂除去受光照部分的光刻胶, 并连接上含所需基团的硅烷或其它化学物质, 除去未受光照部分的光刻胶之后再在该区域接上含另一种基团的化学物质, 从而形成两种不同化学物质的格式化表面。但是光刻设备花费高, 并且要求在净化间内操作, 限制了这一技术在生物实验室的广泛应用。而从光刻法衍生出来的软印法(Soft lithography)[4,5], 将光刻形成的格式转移到弹性印章(如聚二甲基硅氧烷, PDMS)上, 再利用弹性印章进行材料表面的微格式化, 不仅操作简单, 费用降低, 而且一个印章可以多次使用。因此, 软印法已得到了越来越多的应用。软印法可分为微接触转印法(Microcontact printing)[6]和微流道法(Microfluidic channels)[7]。由于烷硫醇可以在金表面形成较有序的自组装单分子层, 微接触转印法往往利用含不同功能团的两种烷硫醇在金基底上进行微格式化, 而很少

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

利用硅烷在硅或玻璃表面形成格式化。利用烷硫醇进行表面格式化时,要求先在硅或玻璃基底上镀上一层钛或铬后,再镀上金,烷硫醇在金表面形成自组装单分子层,其中烷硫醇的硫原子排列在金原子表面上。而在硅和玻璃表面上的自然形成的二氧化硅膜层,经处理成羟基后,可以直接与硅烷进行共价结合。本文偿试通过微接触转印法以二氯二甲基硅烷(DMS)在硅表面形成格式,以及胶原和牛血清白蛋白(Bull serum albumin, BSA)通过微流道形成格式,来控制细胞的黏附。

2　实验材料和方法

2.1　微接触转印

PDMS 弹性印章的制作参照文献[6]中的方法。所用的 PDMS 购于Dow Corning。将聚二甲基硅氧烷预聚物与固化剂以 10∶1(体积比)混合后,浇注到光刻法得到的含周期分布的几何凸起的微格式母模上,并在 60 ℃下固化 2 h。冷却后揭下弹性印章,即可得到用于微接触转印的印章。以DMS 溶液(1% 溶于己烷中)浸湿棉签后,将棉签一次性擦拭 PDMS 印章表面。再以氮气吹干印章后,将印章轻置于经酸碱处理过、并高度亲水的富含羟基的硅片表面上,印章含格式的一面向下与硅片表面接触。在印章的格式中凸起的部分,即与硅片接触的部分,DMS 与亲水硅片表面的羟基发生共价结合,使该部分成为疏水表面。而在格式的凹陷部分,由于DMS 不与硅片接触,硅片表面保持亲水。10 s 后,将 PDMS 印章从硅片上移开,硅片再以乙醇清洗,即形成含所需亲、疏水格式的表面。本实验中制作了两种格式的表面,一种是宽为 300 μm 的条形疏水区域和宽为 150 μm 的条形亲水区域相间隔;另一种是宽为 100 μm 的条形亲水区域相互交叉组成方格,方格内为宽 400 或 200 μm 的疏水区域。

2.2　微流道法

微流道法通过限定流体流经特定区域来实现格式化。用与微接触转印中相同的方法获得 PDMS 印章后,将 PDMS 印章置于经DMS 处理而成为疏水的硅片上,印章中含格式的一面向下与硅片表面接触。在 PDMS 的一端即微流道入口处滴上胶原溶液(0.1 mg/ml PBS),胶原溶液由于毛细现象流入微流道并吸附到表面上。移去 PDMS 印章后,将硅片浸入BSA 溶液(1 mg/ml PBS),吸附 30 min,即形成胶原与BSA 间隔分布的微格式化表面。实验中采用的微流道宽为 100 μm,高约 50 μm,流道间距为 300 μm。胶原为Collagen S(Boehringer Mannheim Gmbh),其主要成分为Ⅰ型胶原。牛血清白蛋白(BSA)购于 Sigma。

2.3　细胞培养与细胞黏附

MC3T3-E1 成骨细胞,由华西医科大学陈槐卿教授馈赠。细胞以含 10% 血清,1% 双抗的DMEM 培养基(Hyclone)培养于 37 ℃,99% 湿度,5% CO_2 的培养箱中,每 3～4 d 传一次。进行黏附实验时,细胞消化下来后,用与培养时相同的培养基,以10^5/ml 细胞接种于放有微格式化表面的培养皿中。细胞黏附 15 h 后,用金相显微镜下观察细胞的黏附,并通过CCD 拍摄图像。

2.4　椭偏光学显微成像法观察格式化表面

椭偏光学显微成像技术是一种超薄膜及表面显示技术,它将传统的光学椭偏术和CCD 摄像、计算机取样和图像处理技术相结合。测量薄膜的厚度分辨率达 10^{-10} m,测量结果直观,可以定量地显示硅片表面有机或生物分子(如蛋白质)膜层的分布[8]。膜层的表面浓度与所拍摄的椭偏图像中的灰度值(Gray scale)成比例。灰度值越高,说明蛋白或有机分子膜层的表面浓度越大。实验中微接触转印法或微流道法制作的微格式化表面,导致了硅片表面局部厚度的增加,因此利用椭偏光学显微成像法可以直观显示微格式化表面。

3　实验结果和讨论

3.1　细胞在微接触转印法格式化表面的黏附

由于DMS 在溶液中较易聚合,有必要对形成的格式进行检测,以确认在硅片上已形成DMS 格式。以水浸润格式化表面,可见被水浸润和不被水浸润的微小区域,证明表面局部亲水,局部疏水。在椭偏光学显微成像系统下观察格式化表面(见图 1),可见灰度值较高的DMS 疏水区域和灰度值较低的无DMS 的亲水区域相间分布。由于硅片表面结合了DMS 后,表面高度比无DMS 区域略有增加,因此在椭偏光学显微成像系统下观察,结合了DMS 区域的灰度值比未结合DMS 的区域的灰度值高。可以确认采用微接触转印法已形成亲水-疏水的格式化表面。将细胞接种于微接触转印法形成的微格式化表面 15 h 后,以金相显微镜观察,结果如图 2 所示。其中图A 为边长 200 μm 的方形疏水区域及其周围宽为 100 μm 的亲水区域形成的格式。图B 为宽 300 μm 的疏水区域和宽 150 μm 的亲水区域相间隔形成的格式。在两种格式下,细胞均优先黏附

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

于亲水的区域。

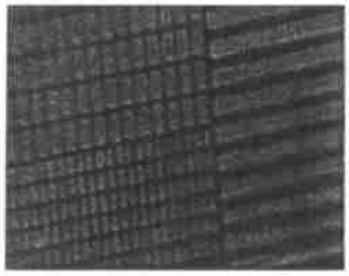


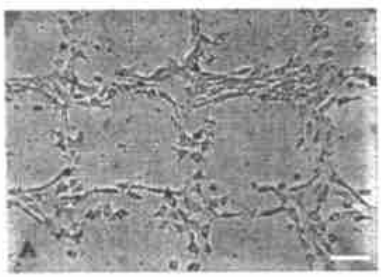
图1 微接触转印法形成的格式化表面的椭偏光学显微成像
左侧灰度值高的为DMS方格,宽分别为400 μm(上)和200 μm(下),方格间是宽为100 μm的灰度值低的亲水区域;右侧灰度值高的是宽300 μm的DMS条形疏水区域,灰度值低的是宽为150 μm的条形亲水区域

Fig 1 Ellipsometric image of microcontact printed surface
Hydrophobic squires with DMS (high gray scale, with width of 400 μm (up) or 200 μm (down)) separated by hydrophilic region (low gray scale, with width of 100 μm) on the left; Hydrophobic lines (high gray scale, 300 μm wide) alternated with hydrophilic lines (low gray scale, 150 μm wide) on the right

以往的实验表明,细胞在材料表面的黏附与材料表面亲水性有关,一般是亲水性强的表面能促进细胞黏附,而疏水表面不能[9]。由于血清中含有成份复杂的蛋白,包括促进细胞黏附的纤黏连蛋白,以及其它不利于细胞黏附的蛋白,而细胞的黏附主要受细胞膜上的受体与基底上的细胞外基质蛋白之间的特异性结合所调节。细胞外基质蛋白与其它不利于细胞黏附的蛋白之间的竞争性吸附是导致细胞在亲水和疏水表面黏附不同的根本原因[10]。实验中DMS硅烷的结合引起的纳米级的高度差别不足以引起细胞黏附的差别[11]。结果表明,利用微接触转印法可以在羟基化基底上形成硅烷的格式化表面,从而实现对细胞黏附的控制。

3.2 细胞在微流道法格式化表面的黏附

用微流道法形成的格式化表面,由于胶原分子量相对BSA要大,胶原在硅片上形成的吸附膜层比BSA的吸附膜层要厚,在椭偏光学显微成像系统下观察,可见灰度值较高的胶原涂层区域与灰度值较低的BSA吸附区域(见图3)。由于胶原是细胞外基质蛋白,而BSA是不促进细胞黏附的蛋白,MC3T3-E1细胞优先黏附在胶原涂层区域(见图4)。



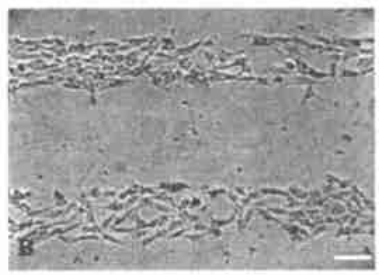


图2 MC3T3-E1成骨细胞在微接触转印格式化表面的黏附
(A和B分别为两种格式的表面,图中标尺为100 μm)

Fig 2 MC3T3-E1 osteoblasts adhesion on microcontact printed surfaces
(A and B are surfaces with two different patterns, scale bar is 100 μm)

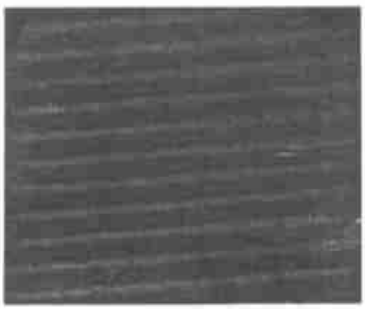


图3 微流道形成的格式化表面的椭偏光学显微成像图
灰度值高的胶原涂层区域(宽100 μm)与灰度值低的含BSA区域(宽300 μm)相间

Fig 3 Ellipsometric image of patterned surface made with microfluidic channels
Collagen coated lines (100 μm wide, high gray scale) are alternated with BSA adsorbed region (300 μm wide, low gray scale)

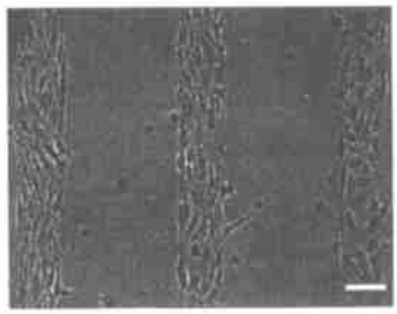


图4 MC3T3-E1成骨细胞在微流道格式化表面的黏附
(图中标尺为100 μm)

Fig 4 MC3T3-E1 osteoblasts adhesion to patterned surfaces made with microfluidic channel
(scale bar is 100 μm)

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

微流道除了可以形成蛋白的微格式化表面, 从而控制细胞的黏附外, 还可以直接用细胞悬液进入微流道, 实现对细胞分布的控制。微流道还可用于细胞共培养, Folch 等[7]利用微流道形成细胞外基质蛋白如纤黏连蛋白的格式化表面后, 将一种细胞先黏附在含细胞外基质蛋白的区域, 移去 PDMS 印章后的裸露的基底再接上更易黏附的成纤维细胞, 实现微格式化的共培养。将不同类型细胞的悬液流经不同的微流道, 同样可以实现细胞的共培养。

总之, 表面微制作技术尤其是软印法形成的微格式化表面, 提供了对培养表面进行物理化学控制的方法, 可以在细胞培养过程中控制细胞的空间分布和黏附。当格式尺寸小到微米级时, 还可以将细胞单个黏附于小岛上, 实现对单个细胞的重复操作, 以及研究细胞形态与细胞的功能之间的关系[12]。

4 结　论

除了烷硫醇外, 硅烷也可以用于微接触转印法进行表面微格式化。微接触转印法形成的亲疏水相间的表面, 以及微流道法形成的不同蛋白的格式化表面均可以很好地控制细胞的黏附和分布。表面微格式化还可用来研究细胞-表面相互作用、细胞形态与功能的关系。

参 考 文 献

1 Buckley CD, Rainger GE, Bradfield PF, *et al*. Cell adhesion: more than just glue. Mol Membr Biol, 1998; 15(4): 167

2 Healy KE, Thoams CH, Rezania A, *et al*. Kinetics of bone cell organization and mineralization on materials with patterned surface chemistry. Biomaterials, 1996; 17: 195

3 Britland S, Clark P, Connolly P, *et al*. Micropatterned substratum adhesiveness: a model for morphogenetic cues controlling cell behavior. Experimental Cell Research, 1992; 198: 124

4 Xia Y, Whitesides GM. Soft lithography. Angew. Chem. Int. Ed, 1998; 37: 550

5 Kane RS, Takayama S, Ostuni E, *et al*. Patterning proteins and cells using soft lithography. Biomaterials, 1999; 20: 2363

6 Chen CS, Mrksich M, Huang S, *et al*. Micropatterned surfaces for control of cell shape, posotion, and function. Biotechnol Prog, 1998; 14: 356

7 Folch A, Ayon A, Hurtadeo O, *et al*. Molding of deep polymethylsioloxane microstructures for microfluidics and biological applications. J Biomech Eng, 1999; 121: 28

8 勒　刚, 孟永宏, 邢建华等. 生物分子吸附膜层的图像显示——光学椭偏显微成像技术应用之一. 测试技术学报, 1998; 12(3): 166

9 Dewez JL, Scheider YJ, Rouxhet PG. Coupled influence of substratum hydrophilicity and surfactant on epithelial cell adhesion. J Biomed Mater Res, 1996; 30: 373

10 Curtis ASG. Forrester JV. The competitive effects of serum proteins on cell adhesion. J Cell Sci, 1984; 71: 17

11 Lom B, Healy KE, Hockberger PE. A versatiole technique for patterning biomolecules onto glass coverslipos. J Neuroscience Methods, 1993; 50: 385

12 Singhvi R, Kumar A, Lopez GP, *et al*. Engineering cell shape and function. Science, 1994; 264: 6

(收稿: 2001-05-11)

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net