

用表面微纳米技术研究细胞水平的生物力学^{*}王 栋 张 伟 蒋兴宇[†]

(国家纳米科学中心 中国科学院纳米生物效应与安全性重点实验室 北京 100190)

摘 要 文章介绍了作者所在的实验小组近年来在用表面微纳米技术研究细胞生物学方面取得的进展. 由于细胞的尺寸在数微米到数十微米之间,应用微纳米技术可以精细地调控细胞微观环境. 作者所在的实验小组应用微流控系统以及表面化学修饰等方法,对细胞正常行为和病理行为进行了一系列研究. 通过设计力学刺激装置,对细胞骨架的主要成分——肌动蛋白对细胞的形状以及粘附、迁移等行为的影响进行了系统研究,实现了对肌动蛋白拉伸过程的全程实时动态观察,发现一次拉伸刺激就可以导致肌动蛋白细胞骨架变短,并可以促进肌动蛋白纤维的重组过程. 此外,作者所在的实验小组还构建了表面三维结构,以模拟生物体内的拓扑结构,并结合微流控、细胞图案化和多种细胞共培养技术,构建了体外细胞培养和相互作用研究模型,发现细胞形状可以影响其极性和迁移的方向,以及神经细胞突起可以感受表面层粘连蛋白的浓度梯度等一系列有趣的现象,并对其机理进行了探讨.

关键词 微纳米技术,软蚀刻,细胞形状,细胞骨架,细胞迁移,生物力学

Studies of cell biomechanics with surface micro-/nano-technology

WANG Dong ZHANG Wei JIANG Xing-Yu[†](Key Lab for Biological Effects of Nanomaterials and Nanosafety of the Chinese Academy of Sciences,
National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190, China)

Abstract We report the recent progress in our studies of cell biology using micro-/nano-technology. Cells have a size of several to tens of microns, which makes them easily manipulated by micro-/nano-technology. The shape of the cell influences the alignment of the actin cytoskeleton, which bears the main forces of the cell, maintains the shape, and mediates a series of biochemical reactions. We invented a stretching device and studied the real-time actin filament dynamics under stretch. We found that one stretch cycle shortened the actin filaments and promoted their reassembly process. Cell migration is a complex mechanical process. We found that cell geometry determines the cell polarity and migration direction. We fabricated three-dimensional surfaces to mimic the topography in vivo, and further built a cell culture model by integrating the three-dimensional surface, microfluidics, cell patterning, and coculturing of multiple cell types. We also investigated the neuronal guidance by surface patterning.

Keywords micro-/nano-technology, soft lithography, cell shape, cytoskeleton, cell migration, biomechanics

1 引言

近年来,微纳米技术在生物科学研究中起着越来越重要的作用. 由微电子学领域发展起来的光刻(photolithography)技术和相关的微加工技术推动了生物学的快速发展,例如 DNA 芯片技术等. 然而由于传统的光刻技术成本高、耗时长、表面可控性

差,常常不能直接应用于蛋白质和细胞中,并且大多数生物学家不能方便地使用这个技术,这些缺点使得光刻技术不能更广泛地应用于生物学研究. Whi-

* 中国科学院方向性项目(批准号:KJ CX2-YW-M15)、国家自然科学基金(批准号:20890020;90813032)、国家重点基础研究发展计划(批准号:2009CB930001)资助项目

2010-11-08 收到

[†] 通讯联系人. Email: xingyujiang@nanoctr.cn

tesides 研究组在传统光刻技术的基础上发展了一系列更为简便而又容易操作的技术,统称为软蚀刻技术(soft lithography)^[1, 2]. 这门新技术主要利用弹性材料在光刻模板基础上通过翻膜的方法复制其表面图案结构,并用这些具有特定表面结构的弹性材料在另一表面上实现生物化学分子的图案化. 这种表面图案化的方法使细胞生物学的研究得以在一个全新的层面上展开,使我们可以精确地控制单个细胞的形状、大小和细胞之间以及细胞与基底之间的相互作用,可以更进一步模拟生物体内的微环境,从而为组织工程和体外生命系统构建提供了坚实的理论和实验基础.

近年来,我们实验小组一直围绕表面微纳米技术适用的材料和表面微纳米技术在细胞生物学中的应用进行深入的研究和探索. 本文将简要介绍近年来我们利用表面微纳米技术在细胞生物学,特别是细胞水平的生物力学方面的研究.

2 软蚀刻以及自组装单层膜技术(self-assembled monolayer, SAM)

软蚀刻技术可用于制作纳米级别的图案. 由于细胞的大小在数微米到数十微米之间,所以软蚀刻技术有可能实现在亚细胞水平上对细胞微环境进行精确控制,而软蚀刻与自组装单层膜技术结合,则可以使这一可能变为现实.

自组装单层膜技术原理是基于金原子与硫醇的巯基发生共价键合而在金表面形成自组装单分子层. 通常实验中都采用金表面,在银和钯表面也可以形成自组装单分子层^[2, 3]. 具有 $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{X}$ 结构的硫醇能在金表面形成最为有序的单分子层结构,其中的“X”为末端有机官能团. 金原子与巯基反应生成致密的硫醇基团阵列,烷基链 $(\text{CH}_2)_n$ 则形成有序结构(见图 1),末端基团 X 则决定单分子层的性质,如亲疏水性、电荷性质、与蛋白质或细胞的粘附性质等等. 研究者可以根据自己的需要设计特定的末端基团,从而使自组装单层膜技术得到更广泛的应用.

软蚀刻技术通过翻模的方法制作具有特定图案的表面,从而使得自组装单层膜技术能在二维平面上更好地控制表面的性质,实现图案化自组装单层膜,使其在生物学中得到更为广泛的应用. 制作的具体过程如图 2 所示:软蚀刻中常用的弹性材料是聚

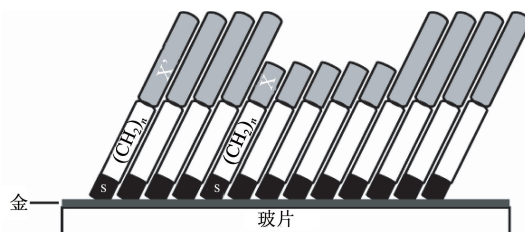


图 1 硫醇分子在金表面形成自组装单层膜结构(图中 X 和 X' 代表两种性质不同的末端基团^[1])

二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS),首先制作 PDMS 印章,用传统光刻的方法制作模板,在模板上倒入液体 PDMS 预聚物,在 60℃ 固化后,将 PDMS 揭下即可得到具有与模板互补图案的 PDMS 印章(见图 2(a));然后利用 PDMS 印章通过微接触印刷(microcontact printing)的方法把硫醇分子转移到金片上,从而实现硫醇分子的图案化. 具体方法是,首先将 PDMS 印章蘸一下硫醇溶液,经吹干后倒扣在金片上,硫醇分子会很快与金原子发生反应形成自组装单分子层,揭开 PDMS 印章,则在金片表面上留下了图案化的硫醇自组装单分子层,再将金片浸泡入另一种硫醇的溶液中,在金片剩余的区域形成另一种硫醇的自组装单分子层,此时在金片表面就形成了两种不同末端基团的、按特定图案分布的硫醇自组装单分子层(见图 2(b)). 这个过程与中国传统的印章刻制过程是十分相似的.

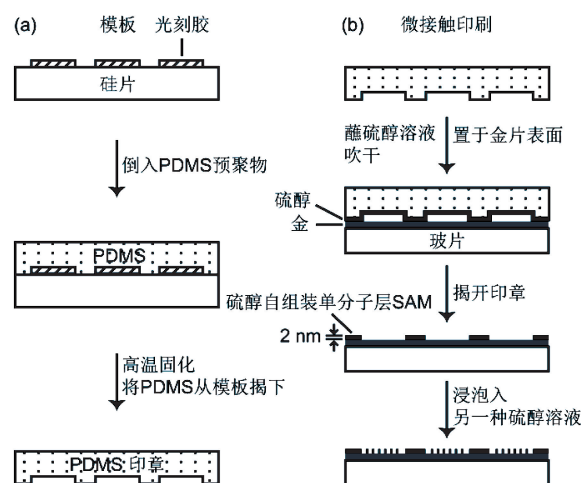


图 2 (a)PDMS 印章的制作;(b)微接触印刷硫醇自组装单分子层^[1]

通常在金表面先印刷一层末端为烷基链的硫醇,蛋白质和细胞可以在其上粘附,再将金片浸泡入末端为 $(\text{EG})_n\text{OH}$ 的硫醇溶液中, $(\text{EG})_n\text{OH}$ 基团能很好地阻止蛋白质或细胞的粘附,从而可以实现蛋白质或细胞在表面的图案化.

利用微接触印刷制作表面分子的图案化,除了

硫醇外,也可以用于其他分子上,如在玻璃或硅片表面印刷硅烷,也可以直接将蛋白质印刷在表面上形成图案。

3 利用表面微纳米技术研究细胞行为

软蚀刻和自组装单层膜(SAM)技术为细胞生物学提供了一系列方法,用这些方法可以模拟生物体内的微环境在体外培养细胞,从而为更精确地研究细胞生物学提供了研究平台。

3.1 细胞形状和力学刺激对细胞骨架的影响

利用微接触印刷可以控制细胞的形状,研究发现细胞形状决定了肌动蛋白细胞骨架的排列方式(见图3)^[4]。

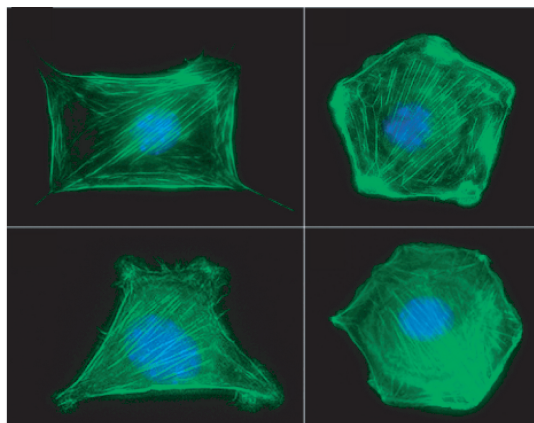


图3 不同形状的细胞肌动蛋白细胞骨架的排列方式(绿色为肌动蛋白纤维,蓝色为细胞核^[4],见《物理》网刊彩图,下同)

肌动蛋白细胞骨架在细胞发挥功能过程中起着重要作用,如在细胞迁移中作为起主要推动作用的力学载体,肌动蛋白细胞骨架维持着细胞形状.细胞形状的变化会引起肌动蛋白细胞骨架排列方式的改变,从而导致细胞的力学性质也同时发生变化,即形状的变化会引起细胞力学性质的变化。

肌动蛋白细胞骨架不但是细胞的力学载体,而且可以感受细胞外微环境中的力学信号,如细胞生长基底的软硬程度和力学刺激,传递到细胞内转化为生物化学信号,引起一系列从分子水平到细胞水平的变化.已有大量研究表明,单轴机械拉伸刺激可以改变细胞形状,使细胞长轴沿与拉伸方向垂直的方向排列,同时肌动蛋白细胞骨架也沿着与拉伸方向垂直的方向排列.这些研究结果再次表明,细胞骨架和细胞形状决定了细胞的力学性质,在外界机械拉伸力学刺激下,细胞为了适应这种力学环境,必然会改变细胞骨架的排列和细胞形状,以达到最

合适的状态.换言之,肌动蛋白细胞骨架作为细胞的力学承载体和细胞外力学信号的感受体,在接受外界力学刺激后,会产生一系列生物化学反应,导致其本身结构的重排和细胞形状的改变。

近年来,我们对肌动蛋白细胞骨架与外界力学刺激的相互作用进行了研究.首先在实验方法上进行了创新和改进.在传统的实验方法中,往往是先对细胞进行一段时间的机械力学刺激,然后杀死细胞,进行免疫染色或生物化学分析.这样的操作流程能够获得大量细胞群体平均的数据,即免疫染色的方法能得到丰富的信息,但是却失去了细胞实时的动态变化,特别是单个细胞在机械拉伸刺激下肌动蛋白细胞骨架的实时动态变化.其中一个重要的原因是,在传统的拉伸装置中,细胞贴壁生长的弹性膜与倒置显微镜的物镜距离较远,使其很难用高倍镜观察,从而不能在对细胞施加机械拉伸刺激的同时,用高倍镜观察肌动蛋白纤维的实时动态变化。

我们研制成功一种细胞拉伸装置,它采用数十微米厚的PDMS弹性膜作为细胞生长基底,并大大拉近了弹性膜与倒置物镜的距离,使得弹性膜在拉伸全程都紧贴下方的盖玻片,从而实现了在对细胞施加机械拉伸刺激的同时,在倒置显微镜下用高倍镜(油镜)观察肌动蛋白纤维的实时动态变化(见图4)^[5]。

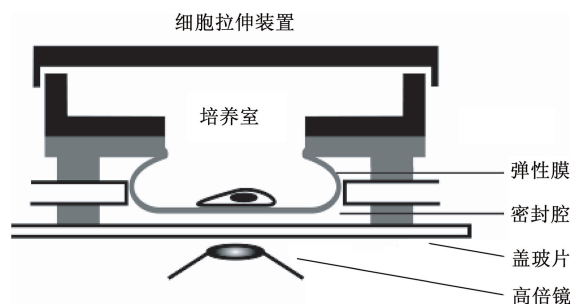


图4 细胞拉伸装置示意图(该装置由上下两层组成:上层为培养室,其底部有孔;下层为密封腔.二者由一个弹性膜分隔开,此弹性膜作为细胞贴壁生长的基底.拉伸之前,在弹性膜与下层的盖玻片之间加入润滑剂,通过对下层的密封腔抽气,使得弹性膜向下压向盖玻片,并在盖玻片的表面发生拉伸形变^[5])

我们发现仅仅一次机械拉伸刺激即可使得肌动蛋白纤维变短,而且拉伸能够促进肌动蛋白纤维的重组过程,使得相邻的几根纤维重组变为一根纤维(见图5)^[5].这足以表明,机械拉伸刺激对肌动蛋白细胞骨架的动态变化起着至关重要的作用。

3.2 细胞形状对细胞迁移的影响

细胞形状影响细胞骨架的排列以及细胞的力学性质,而细胞迁移与细胞的力学性质是息息相关的,

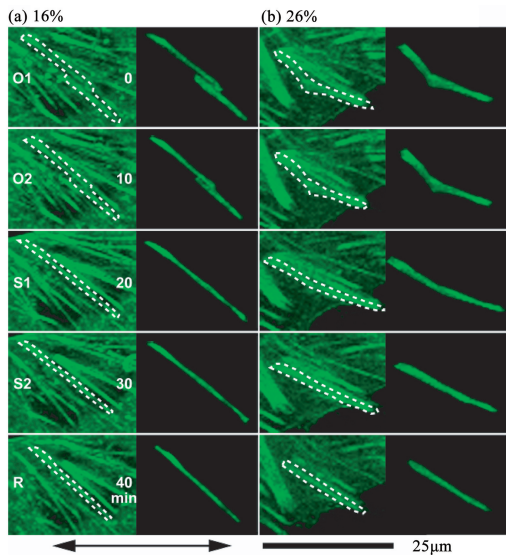


图 5 NIH 3T3 细胞在一次拉伸全程中肌动蛋白纤维(EGFP-actin)的动态变化(拉伸促进了肌动蛋白纤维的重组过程,使得相邻的肌动蛋白纤维重组为一根纤维。“O1 和 O2”:拉伸之前;“S1 和 S2”:保持拉伸状态;“R”:回复到松弛状态^[5])

因此,我们研究了细胞形状对细胞迁移的影响。

在典型的细胞迁移过程中,细胞首先向前伸出伪足,形成新的粘着斑,然后其尾端的粘着斑分解,尾部收缩,从而实现了细胞迁移(见图 6(a))^[6]。伪足的动态调控对细胞迁移有着重要影响,细胞图案化的研究发现,当把细胞局限成方形时,其伪足总是在角落处伸出(见图 6(b))^[4, 6, 7],表明几何形状可以影响伪足的空间调控。这样就带来一个很有意思的问题:如果把细胞局限成一个水滴形,那么其伪足将会倾向于在尖端还是在钝端伸出(见图 6(c))^[6]? 细胞移动的方向将会如何?

我们利用微接触印刷和自组装单层膜的技术把细胞局限成不对称的形状,如水滴型,我们发现,细胞倾向于在图案的钝端伸出伪足(见图 7(c)),免疫染色分析发现,细胞的中心体和高尔基体都倾向位于图案较宽的部分(见图 7(a),(b))。这表明外加的几何形状可以决定细胞的极性。

我们采用电化学方法以脱附金表面的硫醇单分子层,使得图案化的细胞可以自由迁移^[8]。我们发现,电解吸后水滴状的细胞总是沿着面积大的一端迁移(见图 8),我们用其他的非对称形状也得到了类似的结果,如锐角等腰三角形、“V”形和“L”形。而一些对称形状的细胞在电解吸释放后其迁移方向则没有明显的方向性,如圆形和正方形。在长度与宽度比值较大的长方形中,细胞向与其长轴平行的两个方向迁移的几率相似。这充分说明细胞形状决定细胞迁移的方向^[6]。细胞迁移在胚胎发育和形态发生

的过程中起着重要作用,在一些疾病发生过程中,细胞迁移的调控发生紊乱,如癌症转移过程中的癌细胞穿过血管壁迁移到其他组织和器官内。了解细胞迁移的机制不但对基础生物学而且也对临床医学有着重要的意义。

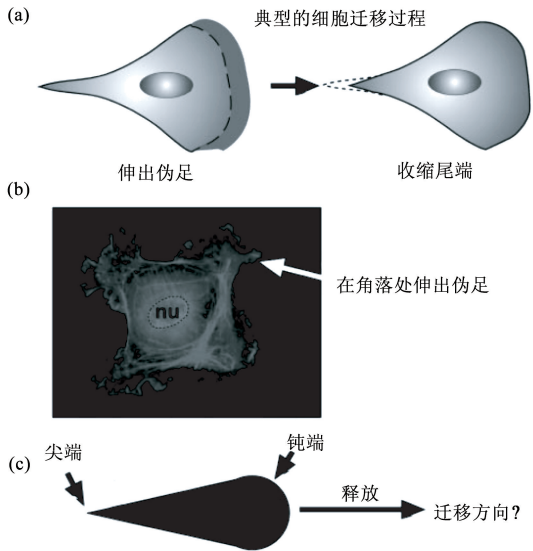


图 6 (a)在典型的细胞迁移过程中,细胞向前伸出伪足,其尾端的部分收缩,从而实现细胞的迁移;(b)把细胞局限成方形,细胞总是倾向于在角落处伸出伪足;(c)当把细胞局限成水滴状时,其伪足将倾向于在尖端还是在钝端伸出? 此时将细胞释放之后,其迁移方向将如何^[6]?

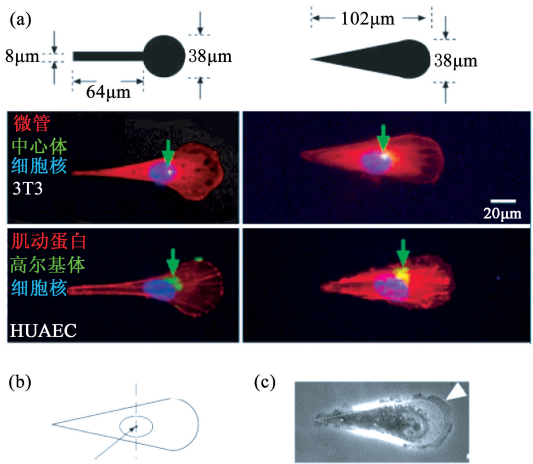


图 7 局限成不对称图案的细胞 (a)细胞的中心体和高尔基体(绿色)都位于靠近图案大端的位置(图中 3T3 为成纤维细胞, HUAEC 为人脐带动脉内皮细胞);(b)箭头所指为细胞的几何中心;(c)水滴形状的细胞在其钝端伸出板状伪足^[6]

3.3 表面微拓扑结构对细胞骨架和细胞迁移的影响

由于细胞在生物体内处于三维的环境中,我们用软蚀刻技术在 PDMS 表面制作微米级别的三维拓扑结构,以此来模拟生物体内的三维环境。

用常规软蚀刻方法制作的表面三维结构都带有棱角,而且需要先制作一个光刻模板,我们提出了一

个简便的方法制作更接近生物体内的比较圆滑的表面三维结构,先把 PDMS 卷曲,再用等离子体处理,然后释放卷曲的 PDMS 表面回复到平整状态,此时在其表面就会产生三维波纹结构(见图 9). 等离子体处理的强度和时间对波纹结构的尺寸有很大影响.

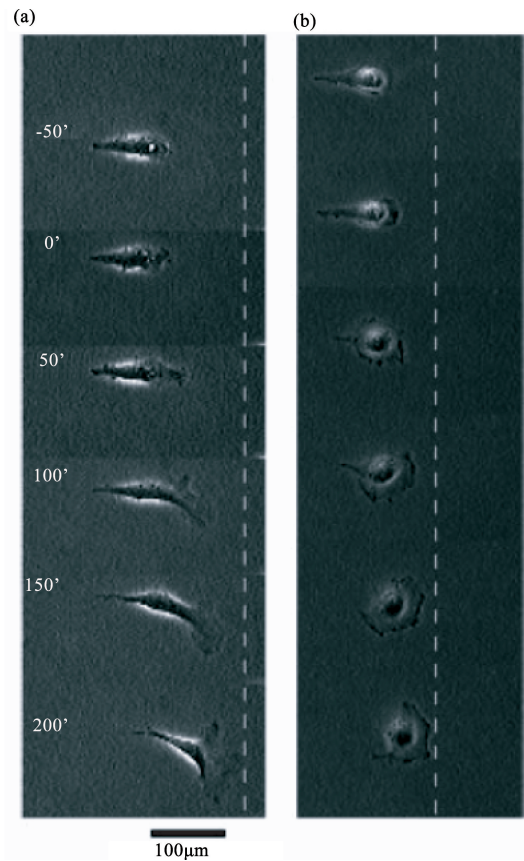


图 8 局限成水滴状的 NIH3T3(a) 和 COS-7(b) 细胞在电解吸释放(“0”为 0 分钟)后向钝端方向迁移^[6]

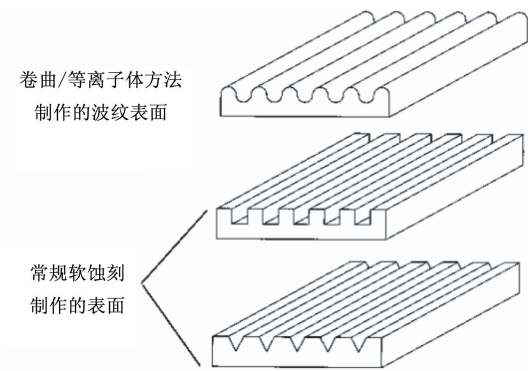


图 9 用卷曲/等离子体方法和常规软蚀刻方法制作的表面三维结构^[9]

我们的研究发现,表面波纹三维结构和常规蚀刻制备的拓扑结构一样,可以诱导细胞的长轴沿着与波纹平行的方向排列,肌动蛋白细胞骨架也与波纹的方向平行(见图 10)^[9]. 这种现象称为“接触诱导”. 接触诱导的机理现在还没有完全研究清楚,表

面微纳米技术为研究细胞在表面的行为提供了强有力的工具,为细胞生物学提供了新的研究视角.

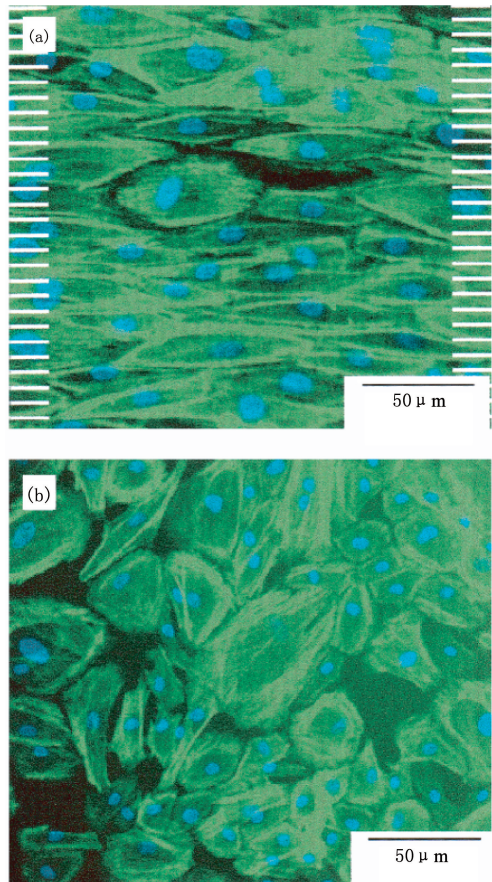


图 10 在波纹状(a)和平整状(b)的 PDMS 表面毛细血管内皮细胞的肌动蛋白纤维的排列(绿色). 波纹状的表面三维结构使得细胞的长轴沿与波纹平行的方向,并且其肌动蛋白细胞骨架也沿与波纹平行的方向排列,而在平整状的 PDMS 表面,细胞形状和肌动蛋白细胞骨架呈随机排列的方式. 蓝色为细胞核^[9]

3.4 表面细胞外基质蛋白对神经细胞突起生长方向的影响

我们实验小组也在构建体外神经细胞培养模型方面做了许多工作,最近的一项研究发现,海马神经细胞的突起会沿着表面层粘连蛋白的条带边缘生长,这可能与神经突起感受表面层粘连蛋白的浓度梯度有关(见图 11)^[10]. 神经细胞的发育和一些神经损伤以及退行性疾病一直是神经生物学研究的前沿和热点,我们利用表面微纳米技术模拟生物体内的细胞微环境,构建神经细胞模型,将有助于更加精细地研究微环境对神经细胞行为和功能的影响.

3.5 利用软蚀刻和自组装单层膜技术构建体外细胞培养模型

表面微纳米技术为细胞生物学提供了强有力的研究工具,我们实验小组最近的一项研究把表面三维结构、微流控、细胞图案化和多种细胞共培养技术

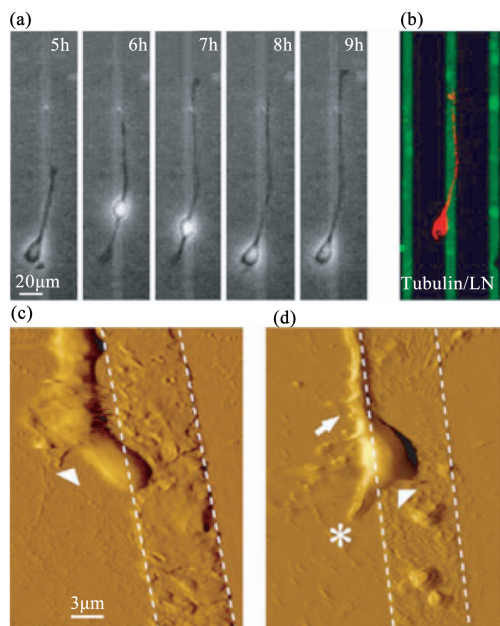


图 11 海马神经细胞突起沿着层粘连蛋白(laminin, LN)条形图案的边缘生长 (a) 神经突起生长的时间序列; (b) 微管蛋白(Tubulin)的免疫染色(红色); (c) 和 (d) 为生长锥(箭头所指)在层粘连蛋白条带(两条虚线之间)上的原子力显微镜(AFM)照片^[10]

结合在一起, 构建了一个体外细胞培养模型(见图 11)^[11]. 该模型利用表面三维结构模拟生物体内的拓扑结构, 利用微流控技术模拟生物体内多种细胞共培养的环境, 利用带孔的 PDMS 薄膜实现了细胞图案化培养^[11]. 该模型综合考虑了生物体内细胞微环境的多种因素, 如表面沟槽的方向不同会导致不同的多种细胞群体行为(见图 12)^[11].

4 结束语

本文对我们实验室近年来在利用表面微纳米技术进行细胞生物学的研究方面所取得的进展作了简

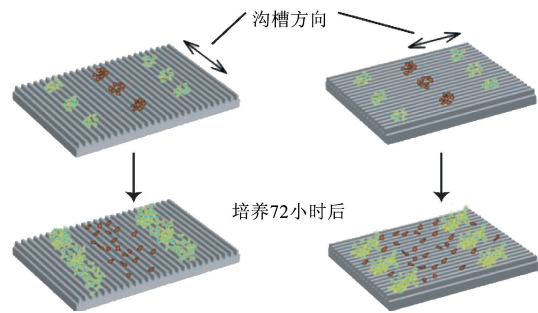


图 12 结合表面三维结构、微流控、细胞图案化和多种细胞共培养技术, 构建体外细胞培养模型^[11]

单介绍. 纳米技术融合了物理学、力学、化学和材料学等多个学科的研究方法, 近年来呈高速发展的趋势, 特别是国内纳米科学的发展在某些方面已逐步引领国际上这些领域的研究方向. 纳米科学与技术无疑给生物学提供了前所未有的机遇, 二者的交叉融合对双方都有不可估量的促进作用. 我们实验室已经在这些方面做了一些探索性的研究, 纳米技术使我们可以更加精细地调控细胞微环境, 相信不久的将来会广泛地应用于传统生物学的实验研究之中.

参考文献

[1] Xia Y N *et al.* Ann. Rev. Mater. Res., 1998, 28: 153
[2] Whitesides G M *et al.* Annu. Rev. Biomed. Eng., 2001, 3: 335
[3] Jiang X Y *et al.* Anal. Chem., 2004, 76: 6116
[4] Brock A *et al.* Langmuir, 2003, 19: 1611
[5] Wang D *et al.* Integr. Biol., 2010, 2: 288
[6] Jiang X Y *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2005, 102: 975
[7] Parker K K *et al.* Faseb J., 2002, 16: 1195
[8] Jiang X Y *et al.* J. Am. Chem. Soc., 2003, 125: 2366
[9] Jiang X Y *et al.* Langmuir, 2002, 18: 3273
[10] Xing S G *et al.* Electrophoresis, 2010, 31: 3144
[11] Yuan B *et al.* Adv. Funct. Mater., 2010, 20: 3715