

VGCC Responsiveness of SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells in the PLLA Three-dimensional Microwell Patterns*

AN Zhixing¹, HUANG Qiping¹, WANG Zhengwei¹, ZHANG Liguang¹, LUO Meirong¹,
LIAO Yanjian¹, JIN Liang¹, KISAALITA W S², LI Chenzhong³, WU Zezhi^{1*}

(1. Key Laboratory of Biorheological Science and Technology under the State Ministry of Education, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China; 2. Cellular Bioengineering Laboratory, Faculty of Engineering, University of Georgia, Athens GA 30602, USA; 3. Nanobioengineering/Bioelectronics Laboratory, Department of Biomedical Engineering, Florida International University, Miami Florida 33174, USA)

Abstract: UV lithography, silicon etching and soft lithography were adopted to fabricate three-dimensional poly-L-lactide (PLLA) microwell patterns. Human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells were integrated with the PLLA patterns, and then cell growth behaviors and distribution were evaluated. Voltage-gated calcium channels (VGCCs) response of SH-SY5Y cells cultured in microwells and on flat PLLA substrates was detected by confocal microscopy with a calcium fluorescent indicator (Calcium Green-1, AM). It was found that SH-SY5Y cells distributed on patterns' top surface showed two-dimensional (2-D) adhesion behavior, while those cells attached to the microwell's side-wall and bottom surface showed three-dimensional (3-D) and boundary two-dimensional (B2-D) adhesion behaviors, respectively. In response to 50 mmol/L high K⁺ depolarization, the percentage of 2-D cells on PLLA flat substrates with positive VGCCs response was 91.2%, while this percentage was 75% and 81% for 3-D and B2-D cells, respectively, significantly lower than that for 2-D cells. These results suggested that cell adhesion behaviors might be critical factors in affecting VGCCs responsiveness of SH-SY5Y cells. Microwell patterns could be an effective way for engineering 3-D microenvironment for neural cell culture and establishing 3-D cell-based biosensing platforms.

Key words: three-dimensional microstructure; SH-SY5Y cell; voltage-gated calcium channel; confocal microscopy; poly-L-lactide

EEACC: 7230J; 7510J

doi: 10.3969/j.issn.1004-1699.2012.03.005

聚乳酸三维微结构条件下人神经母细胞瘤细胞电压 依从式钙通道的功能响应性*

安治星¹, 黄岂平¹, 王正伟¹, 张利光¹, 罗美蓉¹, 廖彦剑¹, 金良¹,
KISAALITA W S², LI Chenzhong³, 吴泽志^{1*}

(1. 重庆大学生物工程学院, 生物流变科学与技术教育部重点实验室, 重庆 400044;

2. 佐治亚大学工程部细胞生物工程实验室, 雅典 佐治亚 30602 美国;

3. 佛罗里达国际大学生物医学工程系纳米生物工程/生物电子实验室, 迈阿密 佛罗里达 33174 美国)

摘要: 以紫外光光刻、硅蚀刻及软光刻技术制备了聚乳酸 (poly-L-lactide, PLLA) 三维微小凹图式, 考察人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 在微小凹结构上的生长与分布行为。以共聚焦显微技术结合钙离子荧光染料 Calcium Green-1, AM 评价 SH-

项目来源: 重庆市科技攻关重点项目 (CSTC2009AB5202); 国家自然科学基金项目 (30870570); 高等学校博士学科点专项科研基金课题 (20100191110032); 教育部国家外专局生物力学与组织修复学科创新引智基地 (111 计划) 项目 (B0623); 重庆大学研究生科技创新基金项目 (CDJXS10231120)

收稿日期: 2011-09-25 修改日期: 2011-11-22

SH-SY5Y 细胞在 PLLA 三维微小凹图式和平面基底上电压依从式钙离子通道 (VGCCs) 的功能响应性。实验发现,分布在微小凹顶部的细胞为二维生长方式,凹内侧壁的为三维生长方式,凹内底部的为边界二维生长方式;以 50 mmol/L 高钾溶液去极化刺激发现,三维及边界二维细胞 VGCCs 阳性响应比率为 75% 和 81% 较平面培养的 91.2% 明显降低。上述结果表明,PLLA 三维微结构及细胞生长行为是影响 SH-SY5Y 细胞 VGCCs 功能响应性的重要因素,微小凹图式是模拟神经细胞三维生长环境进而构建三维细胞生物传感器的有效途径。

关键词: 三维微结构; 人神经母细胞瘤细胞; 电压依从式钙离子通道; 共聚焦显微技术; 聚乳酸

中图分类号: R329.2.7; Q274

文献标识码: A

文章编号: 1004-1699(2012)03-0306-07

随着组织工程和细胞工程的兴起及发展,构建细胞生长的三维培养模型逐渐受到关注,并已经成为研究的热点。三维培养体系为体外细胞培养提供了与其组织来源相似甚至相同的细胞生长微环境,使得细胞的生长方式更接近于体内^[1]。以往传统的三维培养模型中,三维多孔支架^[2]已在组织形成、血管发育和器官再造等发育生物学的分支领域得到了广泛的应用。同时在细胞培养的实践中,水凝胶支架^[3]被用来研究三维细胞的生长行为也为人们所接受。近年来,由于微纳米加工技术与细胞培养技术的结合,使人们对细胞与三维微结构之间的相互作用有了更深入的理解,如三维微结构可以更好地反映神经细胞在体内的粘附、形态铺展、增殖、凋亡以及干细胞定向与分化^[4-5]。

虽然微结构环境对神经细胞生长与分化等行为的影响已受到广泛的关注,但是有关神经细胞在三维微结构条件下的细胞膜离子通道功能表达的研究却很少有所报道。在以神经细胞为基础的三维微系统中,细胞离子通道是药物筛选和毒物评价的重要潜在靶标,其功能表达可能作为三维环境区别于二维培养的重要指标。电压依从式钙离子通道 (Voltage Gated Calcium Channels, VGCCs),是与多种神经及心血管系统疾病有关的离子通道和重要的药物筛选靶标^[6]。前期的研究显示,人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 在高纵横比 SU-8 微结构中,细胞铺展程度降低且更易形成三维细胞聚集,同时 VGCCs 功能响应性也低于二维平面结构上细胞的相应值^[7-8]。这一结果提示,采用适当的微结构培养细胞可能有利于细胞以三维方式生长,并可能获得不同于二维条件下的细胞 VGCCs 靶标功能响应性。

本文采用紫外光光刻、硅蚀刻及软光刻技术,加工了 3 种不同结构尺寸的聚乳酸 (poly-L-lactide, PLLA) 三维微小凹图式。以 SH-SY5Y 细胞在 PLLA 三维微小凹图式上进行复合培养并进而评价细胞在微结构环境下的 VGCCs 功能响应性。结果发现,所制备微小凹图式具有良好的生物相容性且 SH-

SY5Y 细胞在微小凹图式中表现出明显的三维和边界二维生长方式。以钙离子荧光染料结合共聚焦显微技术的研究表明三维和边界二维生长方式下 SH-SY5Y 细胞较之二维平面条件下表现出不同的 VGCCs 功能响应性。上述研究表明,PLLA 三维微结构及 SH-SY5Y 细胞生长行为是影响其 VGCCs 功能响应性的重要因素,微小凹图式是模拟神经细胞三维生长环境进而构建三维细胞生物传感器的有效途径。

1 材料与方法

1.1 PLLA 三维微小凹结构的制备

PLLA 三维微小凹结构的制备过程包括光掩模的设计及加工、紫外光光刻、硅蚀刻、以聚二甲基硅氧烷 [polydimethylsiloxane, PDMS (Sylgard 184, Dow Corning 美国)] 为基础的软光刻以及微浮雕加工等过程。主模采用 P<100>硅片(电阻率 7~13,北京有研)进行加工,PDMS 负模的加工及软光刻在本实验室进行。研究中加工的微小凹直径分别为 80 μm、100 μm 和 120 μm,小凹间距 20 μm,行间距 40 μm。将 0.2 g PLLA(相对分子量 10 万,济南岱罡生物科技有限公司)置于盖玻片上,以加热板 (HP7, JKA-Works Inc, 德国) 加热至 140 °C 时 PLLA 呈熔融状态,将 PLLA 在盖玻片上涂布均匀。样本被转移到预热至 140 °C 的热压机 (TS-C40DX-H, 深圳市泰科盛自动化系统有限公司) 的热压平台上,将 PDMS 微小凹结构负模放置于 PLLA 上,以 0.5 MPa 的压力施压 5 s,熔融状态的 PLLA 将依靠虹吸作用渗入 PDMS 的微结构间隙,在酒精中浸泡 1 min,剥离 PDMS 负模,即得到 PLLA 三维微结构。PLLA 二维平面基底是以平整硅片代替主模用上述同样方法制得。制备得到的 PLLA 三维微结构及 PLLA 二维平面结构经紫外光照射 1 h 灭菌,以磷酸缓冲液 (PBS) 清洗 2 次,每次 5 min,再以 1 640 培养基浸泡 2 h 待用。

1.2 细胞培养

SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞购买于 ATCC, 以 75cm² 培养瓶 (Corning, 美国) 在 37 °C, 5% CO₂

的条件下常规培养。完全培养基由 1640 基础培养基(Hyclone 美国)添加 10% 热灭活胎牛血清(GIBCO 美国)、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸链霉素(Sigma 美国)构成。当细胞生长到 75% 的融合度时,采用胰蛋白酶(Hyclone 美国)消化并加以机械吹打法收集细胞,以完全培养基制备细胞悬浮液。将上述 PLLA 微结构及 PLLA 二维平面结构置放入 35 mm^2 的平面培养皿(FALCON 美国)中。将细胞悬液接种于放置于平面培养皿中的 PLLA 三维微结构及 PLLA 平面二维结构上,细胞接种密度约 $3.2 \times 10^5/\text{mL}$ 。

1.3 PLLA 三维微小凹图式上细胞生长行为的评价

SH-SY5Y 细胞接种于三维微小凹图式上 2 天后,采用 Olympus CKX41 倒置显微镜和 Canon PC1200 数码相机拍摄相差显微照片,观察并定量评价细胞在图式上的生长与分布行为。实验计数了细胞在图式上三维、二维以及边界二维生长方式的百分比,以三维生长方式的细胞数量百分比作为评价相应图式形成三维生长与分布方式能力的评价指标。

1.4 扫描电子显微镜

PLLA 三维微小凹结构上培养的细胞经 0.9% 生理盐水洗涤 3 次,以 2.5% 戊二醛(pH 7.2~7.4)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜,再用 0.9% 的生理盐水冲洗 2 次,每次 15 min。分别使用 30%、50%、70%、80%、95% 和 100% (2 次)的乙醇进行梯度脱水,每步 5 min。样品进一步使用 50%、70%、90%、95% 和 100% (2 次)的叔丁醇进行梯度脱水,每步 5 min。样品经自然干燥后,溅射涂膜镀金 3~5 次,每次 20 s。扫描电镜照片的拍摄采用扫描电子显微镜(HITACHI S-3400N,日本)进行,加速电压设置为 15 kV。

1.5 VGCCs 功能响应性评价

在细胞接种后的第 2 天,三维微结构和平面条件下培养的 SH-SY5Y 细胞均进行 VGCCs 功能响应性的评价。VGCCs 的功能响应性采用对细胞进行高钾溶液(50 mmol/L)刺激后,检测细胞钙离子内流的动态变化来评价。为了观察胞内钙离子动态变

化,采用细胞膜通透性钙离子荧光染料 Calcium Green-1 AM(Invitrogen 美国)对细胞进行荧光染色。荧光强度变化采用激光共聚焦扫描显微镜(Leica Sp5 德国)检测,物镜使用高数值孔径 1.25 的 40 \times 复消色差油镜。培养 2 天的 SH-SY5Y 细胞经 HEPES 缓冲盐溶液(HEPES Buffered saline, HBS)清洗 2 次后,以含有 5 μm 的 Calcium Green-1 AM 并添加 3% FBS 和 0.02% Pluronic F-127(Pepro-Tech 美国)的 HBS 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的条件下孵育 40 min。样品经 HBS 清洗 2 次,再以 1 mL HBS 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的条件下孵育 20 min 达到完全去酯化。Calcium Green-1 以 488 nm 的激发光激发,以波长为 515 nm 的长通滤光片采集激光共聚焦信号。采用每 3 s 一幅的时间扫描模式采集共聚焦图像。当采集图像开始后,于细胞 HBS 孵育液中加入含 500 mmol/L K^+ 的 HBS 缓冲液使孵育液 K^+ 终浓度为 50 mmol/L。VGCCs 的功能响应性通过细胞受高钾去极化后的胞内 Calcium Green-1 相对荧光强度变化来评价。采用如下公式^[9]计算 SH-SY5Y 细胞 VGCCs 功能响应的幅度值:

$$R = (F - F_{\text{pre}}) / (F_{\text{pre}} - F_{\text{bgnd}}) \quad (1)$$

其中 R 为胞内相对荧光变化值,即 VGCCs 功能响应幅度值, F 为高钾刺激后荧光强度峰值, F_{pre} 为高钾刺激前荧光强度平均值, F_{bgnd} 为背景荧光强度值。

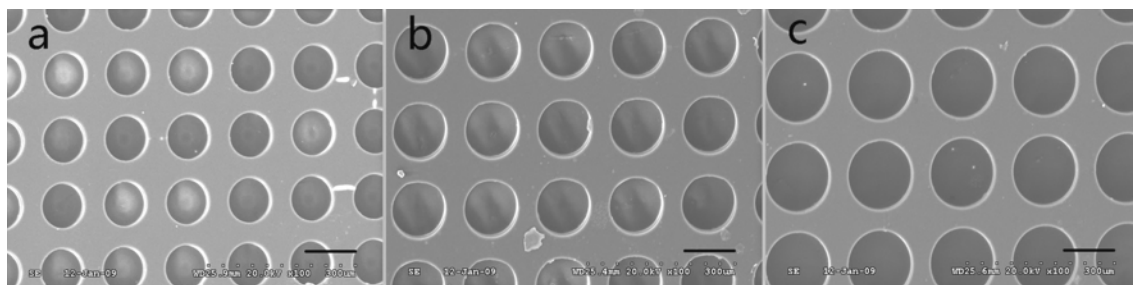
1.6 统计学处理

三维微小凹图式中三维细胞比例和激光共聚焦显微技术测得的细胞 Calcium Green-1 相对荧光强度变化值均采用两样本均数的 t 检验进行统计学分析;二维、边界二维及三维生长方式下细胞 VGCCs 功能响应幅度值的频数分布以非参数双样本 Mann-Whitney 检验进行统计学检验。

2 结果

2.1 三维微小凹图式的制备

图 1 为实验室制备的不同结构尺寸的三维微小凹图式的扫描电镜照片。图中孔径名义直径分别为



图示孔径为 80 μm (a)、100 μm (b) 和 120 μm (c) 的三维微小凹图式的电子显微图片。标尺示 100 μm 。

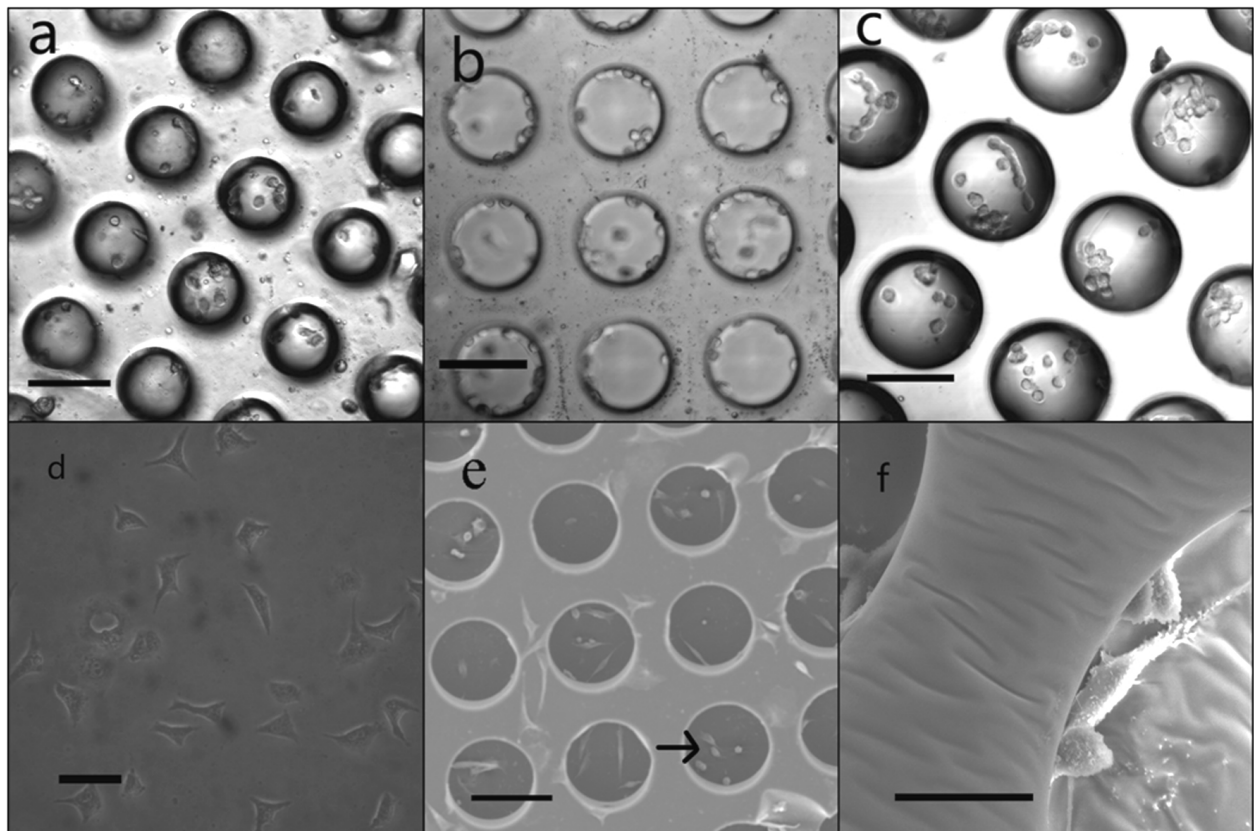
图 1 三维微小凹图式的扫描电子显微图片

80 μm (a)、100 μm (b) 以及 120 μm (c)。小凹间距为 20 μm , 行间距为 40 μm 。从图中可见, 在实验条件下使用紫外光刻、硅蚀刻和软光刻技术能够制备结构规整、清晰的三维微小凹图式, 且各结构孔径和间距均符合预期设计要求。

2.2 SH-SY5Y 细胞与 PLLA 三维微小凹的复合

图 2 示 SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞接种于三维微小凹图式及平面基底 2d 后的典型生长与分布行为。从图中可见, 孔径 80 μm 的微小凹(图 2a)中仅有少量细胞生长; 孔径 100 μm 的微小凹(图 2b)中的细胞大多黏附于侧壁生长; 孔径 120 μm 的微小凹(图 2c)中有大量细胞, 但多数聚集在微小凹底部生长。结合细胞与微小凹图式复合的电镜显微

图(图 2e、2f)发现, 在微小凹图式上 SH-SY5Y 细胞表现出三种基本生长方式: 在结构表面的细胞能够较好铺展, 部分细胞出现明显的神经突起(图 2e), 类似于平面二维基底培养细胞的生长行为(图 2d); 在微小凹内部, 部分细胞黏附于微小凹侧壁(图 2f), 细胞铺展程度低, 容易聚团形成细胞簇。根据微小凹图式的高结构纵横比(≥ 1)^[4]可知, 这是三维生长方式; 部分在微小凹内部的细胞, 仅黏附于底部, 由于空间限制不能铺展和形成神经突起, 如图 2c 中微小凹内的大部分细胞和图 2e 中箭头所指的细胞, 其形态基本上为圆型, 这是一种有边界的二维生长方式。从图中可见微小凹的三维微结构环境可以影响乃至控制细胞的形态变化。



图中微小凹直径分别为 80 μm (a)、100 μm (b、e、f) 和 120 μm (c)。图 a、b 和 c 为三维微小凹图式与细胞复合的相差显微图, 图 d 为 PLLA 平面基底与细胞复合的相差显微图, 图 e 和 f 为 100 μm 的三维微小凹图式与细胞复合的扫描电子显微图。标尺示 100 μm (a、b、c 和 e) 或 20 μm (d 和 f)

图 2 SH-SY5Y 细胞与 PLLA 三微微小凹图式及平面基底复合 2 天后的细胞生长情况。

2.3 PLLA 三维微小凹结构形成细胞三维生长方式的能力

为了定量比较本文所采用的三种微小凹图式形成细胞三维生长方式的能力, 我们以相差显微图像为基础计数了 SH-SY5Y 细胞在图式上呈二维、三维及边界二维生长的细胞数量。表 1 为小凹名义直径分别为 80 μm 、100 μm 和 120 μm 的图式上三种生

长方式的细胞相对百分比。从表中可见, 孔径 80 μm 、100 μm 和 120 μm 的三维方式生长的细胞占总细胞数的比例分别为 23.4% \pm 9.1%、34.5% \pm 12% 和 17.3% \pm 3.5%。孔径 100 μm 微小凹中三维方式生长细胞的相对百分比明显高于 80 μm 和 120 μm 微小凹 ($P < 0.05$)。这一结果提示在 100 μm 微小凹结构中更利于细胞以三维方式生长。

表1 三维、边界二维及二维 SH-SY5Y 细胞在不同结构中的比例

孔径/ μm	3D 细胞	细胞数	边界 2D 细胞	细胞数	2D 细胞	细胞数
80	23.4% \pm 9.1%* ($n=20$)	171	24.1% \pm 6.5% ($n=20$)	181	52.5% \pm 10% ($n=20$)	403
100	34.5% \pm 12% ($n=20$)	266	25.9% \pm 8.5% ($n=20$)	198	39.6% \pm 9.8% ($n=20$)	312
120	17.3% \pm 3.5%* ($n=20$)	116	41.2% \pm 9.9% ($n=20$)	281	41.5% \pm 12% ($n=20$)	303

注:与孔径 100 μm 微小凹,* $P<0.05$ 。 n 为视野数。

2.4 SH-SY5Y 细胞的 VGCCs 功能响应性

VGCCs 的功能响应性以细胞在高钾溶液 (50 mmol/L) 刺激下胞内钙离子内流动态变化来评价。使用钙离子荧光染料 Calcium Green-1 对细胞染色后,在激光共聚焦显微动态采样的条件下钙离子内流将表现为胞内相对荧光强度的增加。图 3 示 SH-SY5Y 细胞在高钾溶液 (50 mmol/L) 刺激后阳性响应和无响应细胞胞内荧光强度随时间变化的过程。插图显示的是阳性响应细胞胞内荧光强度随时间变化的共聚焦显微图像,在荧光峰值的强度要高于初始和恢复期的强度。

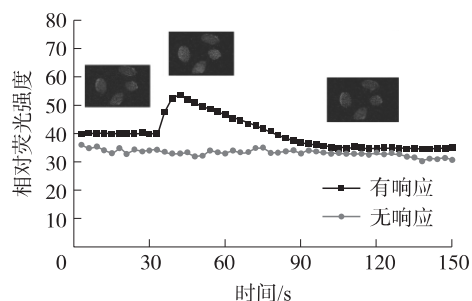


图3 50 mmol/L 高钾溶液去极化刺激诱发的 SH-SY5Y 细胞的钙离子荧光瞬态变化。

图示为在二维 PLLA 平面基底上生长 2 天的阳性响应细胞 (93 个细胞) 与无响应细胞 (9 个细胞) 的钙离子相对荧光强度的平均变化趋势。细胞具备 VGCCs 功能响应性的判断标准是在高钾溶液刺激下细胞荧光强度增加 15% 或以上。图中插入的是在二维 PLLA 平面基底上生长 2 天的细胞的共聚焦图像。插图显示的是 SH-SY5Y 细胞从去极化前 15 s 到荧光恢复的 120 s 之间的荧光强度的变化。

图 4 显示的是 PLLA 二维平面基底上生长的细胞 (2D) 以及孔径 100 μm 的三维微小凹中呈三维生长的细胞 (3D) 和呈边界二维生长的细胞 (边界 2D) 生长 2 天后的胞内平均钙离子相对荧光强度的变化。图中结果表明,在高钾溶液去极化刺激下,二维平面生长的细胞响应幅度明显高于微小凹中三维方式生长的细胞,而微小凹中呈边界二维方式生长的细胞的响应幅度介于以上两种生长方式的细胞之间。

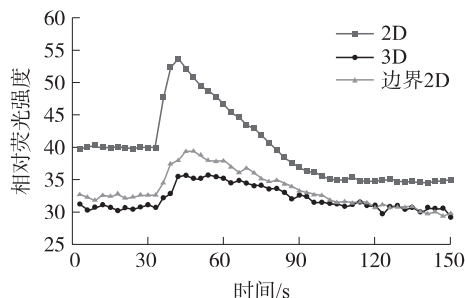


图4 二维及三维微小凹结构中生长 2 天的细胞经过高钾溶液去极化后的相对荧光强度变化

为了定量评价在微小凹图式中呈三维和边界二维生长的细胞以及 PLLA 平面基底上呈二维生长的细胞在高钾溶液去极化刺激下阳性细胞钙离子内流的幅度,采用式 (1) 对阳性细胞 Calcium Green-1 相对荧光强度变化值 (VGCCs 功能响应幅度值) 进行计算。从表 2 可见,PLLA 平面结构上二维生长的阳性细胞 VGCCs 响应幅度值 (0.43 \pm 0.13) 明显高于微小凹图式中的三维方式生长的阳性细胞 (0.30 \pm 0.12) ($P<0.01$) 以及边界二维方式生长的阳性细胞 (0.38 \pm 0.18) ($P<0.05$) 的相应值。

表2 SH-SY5Y 细胞经高钾去极化刺激的阳性响应细胞百分比及响应幅度

	2D 细胞	3D 细胞	边界 2D 细胞
阳性响应比例	93/102 =91.2%	36/48 =75.0%	47/58 =81.0%
响应幅度	0.43 \pm 0.13 ($n=93$)*#	0.30 \pm 0.12 ($n=36$)**	0.38 \pm 0.18 ($n=47$)**

注:2D 细胞与 3D 细胞比较,* $P<0.01$;2D 细胞与边界 2D 细胞比较,# $P<0.05$;3D 细胞与边界 2D 细胞比较,** $P<0.05$ 。 n : 所测细胞个数。细胞平均荧光强度的动态变化见图 4。

为了深入了解不同生长方式细胞的 VGCCs 响应幅度的分布差异,以非参数双样本 Mann-Whitney 检验了 VGCCs 响应幅度的频数分布。在 SH-SY5Y 细胞受高钾溶液去极化刺激后,二维 PLLA 结构上 VGCCs 阳性反应细胞为 91.2%,响应幅度超过 0.3 的细胞达到 71%;在三维微小凹中,边界 2D 阳性细胞为 81%,响应幅度超过 0.3 的细胞比例为 43%,

显著低于2D生长的相应值($P < 0.05$); 而3D阳性细胞比例为75%, 响应幅度超过0.3的细胞比例仅为31%, 显著低于2D($P < 0.01$)及边界2D($P < 0.05$)细胞的相应值。

3 讨论

在细胞三维培养研究领域, 三维材料及支架的经典加工方法通常包括液相分离法、盐类浸出法等, 然而这些加工方法所制备的微结构往往难以在微观尺度上精确控制材料的结构特征, 从而导致细胞在结构上分布及功能分化的随机性。与此相对应的是, 微加工技术与细胞培养相结合的优势是, 微加工的方法可以精确控制材料在微米级乃至亚微米级的结构尺寸和材料特性进而制备图式化的细胞培养基底, 这使得系统研究材料微观结构与细胞功能的相关性成为可能。在三维细胞培养基底的制备中, 一个重要的结构参数是所制备结构的纵横比(aspect ratio)。如所制备的微结构纵横比过小(如小于1^[10]), 微结构基底将难以构成细胞培养的三维微环境^[10]。本研究采用生物可降解材料所制备出的微小凹图式结构, 其纵横比都接近或大于1^[4], 符合工程化构建三维细胞微环境的要求。细胞培养实验发现, 三维微小凹图式微孔中细胞比例高达50%左右, 其中孔径为100 μm 微小凹图式的微孔中细胞的比例达到60.4%, 这表明该微小凹结构可以提供理想的细胞生长微环境。

SH-SY5Y细胞是人神经母细胞瘤的一种分化程度较低的肿瘤细胞株^[11]。在实验所用的平面培养条件下, 该细胞能很好的贴壁生长, 胞体能充分铺展, 并形成少量细胞突起(图2d)。以PLLA微小凹图式进行的实验表明, 三维微小凹结构不仅支持细胞的粘附和贴壁生长, 而且可以形成典型的细胞三维生长方式(图2f)。对不同生长方式的细胞统计分析发现, 在孔径100 μm 的微小凹中34.5%的细胞表现为三维生长方式, 即粘附于凹内侧壁, 铺展程度明显低于平面基底上的细胞, 且容易形成细胞簇。值得注意的是, 在边界二维生长方式中, 细胞粘附于微小凹底部, 铺展程度也降低甚至趋于圆形。与普通二维条件下的细胞生长行为相比较, 边界二维生长方式下的细胞形态更接近于三维生长方式时的细胞形态, 这可能与细胞受到微小凹边界的限制导致无法完全铺展有关, 提示边界二维生长方式是不同于普通平面二维条件的生长方式。上述结果表明, 三维微小凹图式可能成为工程化构建细胞三维生长微环境的有效手段。

对细胞VGCCs功能响应性的研究发现, 在PLLA三维微小凹图式中呈三维生长方式细胞的VGCCs响应性[阳性反应细胞比例为75%, 响应幅度为 0.30 ± 0.12 ($n=36$)]明显低于在PLLA平面结构上呈二维生长细胞的VGCCs功能响应性[阳性反应细胞比例为91.2%, 响应幅度为 0.43 ± 0.13 ($n=93$)] ($P < 0.01$)。这一结果与前期采用SU-8微小凹图式的研究结果一致^[7]。微小凹中三维生长细胞的VGCCs功能响应性提供了一个具体的实例, 验证了普通二维条件下的细胞功能特性较之于体内及三维条件下可能呈现“夸大”效应的推测^[12]。

对边界二维生长方式细胞的VGCCs功能响应性的研究表明, 其VGCCs功能响应性[阳性响应细胞比例81.0%, 响应幅度为 0.38 ± 0.18 ($n=47$)]低于二维生长细胞($P < 0.05$)但高于三维生长细胞($P < 0.05$)的相应值。结合三维微小凹图式中边界二维细胞的分布及形态(接近于三维细胞的铺展行为), 本文所定义的边界二维生长方式在细胞功能特性上可能是二维和三维生长方式之间的一种过渡状态。上述结果提示, 细胞在培养基底及材料支架上的生长形态是决定细胞功能状态和三维功能特性的重要因素。

Baker和Atkin等^[13]对静电聚苯乙烯构建的三维支架进行研究, 发现微观尺寸的三维培养系统较之刚性二维培养系统, 会导致细胞形状趋于圆形, 铺展面积减小。吴泽志等^[14]对微球阵列拓扑结构上细胞的VGCCs功能响应的研究也发现, 细胞的铺展面积越大其VGCCs功能响应幅度越大。本文研究发现, 随着三维、边界二维条件下细胞铺展程度降低, 细胞VGCCs功能响应性相应降低, 而二维生长细胞的高度铺展伴随着较高的VGCCs功能响应性。有关这一现象的机制目前尚不清楚, 推测可能与细胞铺展程度增加使得细胞膜被牵张从而导致牵张敏感离子通道开放有关^[15]。

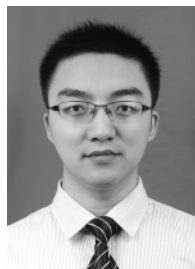
4 结论

以紫外光光刻、硅蚀刻及软光刻技术制备了小凹间距20 μm , 行间距40 μm , 孔径分别为80 μm 、100 μm 和120 μm 的聚乳酸三维微小凹图式。其中孔径100 μm 的三维微小凹图式可以促进神经细胞呈三维方式生长, 同时引起神经细胞电压依从式钙通道的功能响应性降低。实验结果与前期采用SU-8微小凹图式的研究结果一致, 验证了体外二维培养的细胞功能较体内及三维条件下可能呈现“夸大”效应的假设。边界二维生长方式细胞的VGCCs

功能响应性低于二维生长细胞但高于三维生长细胞的相应值,提示这一生长方式在细胞功能特性上可能是二维和三维生长方式之间的一种过渡状态。本研究所制备的三维微小凹图式可能是模拟神经细胞三维生长环境进而构建三维细胞生物传感器的有效途径。

参考文献:

- [1] Abbott A. Cell Culture: Biology's New Dimension [J]. Nature, 2003, 424(6951): 870-872.
- [2] Bokhari M, Camachan R J, Cameron N R, et al. Novel Cell Culture Device Enabling Three-Dimensional Cell Growth and Improved Cell Function [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 354(4): 1095-1100.
- [3] Desai A, Kisaalita W S, Keith C, et al. Human Neuroblastoma (SH-SY5Y) Cell Culture and Differentiation in 3-D Collagen Hydrogels for Cell-Based Biosensing [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2006, 21(8): 1483-1492.
- [4] 吴泽志, Kisaalita W S, ZHAO Y P, 等. 三维微小凹图式的加工及其与人神经母细胞瘤细胞的复合 [J]. 传感技术学报, 2009, 22(3): 297-302.
- [5] 吕艳玲, 吴泽志, 张利光, 等. 大鼠海马神经干细胞的扩增及与三维微小凹图式复合的研究 [J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(6): 520-524.
- [6] Denyer J, Worley J, Cox B, et al. HTS Approaches to Voltage-Gated Ion Channel Drug Discovery [J]. Drug Discov Today, 1998, 3(7): 323-332.
- [7] Wang L, Wu Z Z, Xu B, et al. SU-8 Microstructure for Quasi-Three-Dimensional Cell-Based Biosensing [J]. Sensors and Actuators B Chemical, 2009, 140(2): 349-355.
- [8] Wu Z Z, Zhao Y P, Kisaalita W S. Interfacing SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells with SU-8 Microstructures [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2006, 52(1): 14-21.
- [9] D'Ascenzo M, Piacentini R, Casalbore P, et al. Role of L-Type Ca^{2+} Channels in Neural Stem/progenitor Cell Differentiation [J]. European Journal of Neuroscience, 2006, 23(4): 935-944.
- [10] Claverol-Tinture E, Ghirardi M, Fiumara F, et al. Multielectrode Arrays with Elastomeric Microstructured Overlays for Extracellular Recordings from Patterned Neurons [J]. J Neural Eng, 2005, 2(2): L1-L7.
- [11] 王文, 孙芳玲, 安宜, 等. 莫诺昔抑制过氧化氢诱导的 SH-SY5Y 神经细胞钙超载和细胞毒 [J]. 中国康复理论与实践, 2009, 15(3): 201-202.
- [12] Cukierman E, Pankov R, Stevens D R, et al. Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension [J]. Science, 2001, 294(5547): 1708-1712.
- [13] Baker S C, Atkin N, Gunning P A, et al. Characterization of Electrospun Polystyrene Scaffolds for Three-Dimensional in Vitro Biological Studies [J]. Biomaterials, 2006, 27(16): 3136-3146.
- [14] 吴泽志, 朱满根, Kisaalita W S, 等. 阵列型微拓扑结构基底的制备及其对神经细胞电生理物理特性的影响 [J]. 传感技术学报, 2011, 24(4): 467-474.
- [15] Martinez E, Engel E, Planell J A, et al. Effects of Artificial Micro and Nano-Structured Surfaces on Cell Behavior [J]. Ann Anat, 2009, 191(1): 126-135.



安治星(1985-),男,现为重庆大学硕士研究生,主要研究方向为细胞微纳米工程及细胞微系统,anzhixing729416@163.com;



黄岂平(1972-),男,博士,副教授,硕士生导师,现任职于重庆大学生物工程学院,从事细胞力学信号转导,细胞与胞外基质相互作用等研究,huangqp@cqu.edu.cn;



吴泽志(1965-),男,博士,教授,博士生导师,曾先后在日本东北大学和美国佐治亚大学物理与天文学系、生物与农业工程系及再生生物科学中心从事研究工作,近十余年从事细胞流变学及细胞工程的研究,形成了肝细胞及肝癌细胞流变学方向,近年从事神经细胞与三维微结构相互作用的研究,zzwu@cqu.edu.cn。