

- Aromatic-Crops*, 1(2):151-153;10ref.
- [32] Ozaki-Y, Narikiyo-K, et al., 1998, *Journal-of-the-Faculty-of-Agriculture, -Kyushu-Univer sity*, 43(1-2):83-88.
- [33] Mark W. Farnham, Ellis J. Caniglia, et al., 1998, *Hort. Science*, 33(2):323-327.
- [34] Zhang XP, Rhodes BB, Whitesides JF, 1994, *Cucurbit Genet Coop Rep*, 17:102-105.
- [35] M. Hagimori, M. Nagaoka et al., 1992, *Thero Appl Genet*, 84:819-824.
- [36] J. Preiszner, A. Feher, O. Veisz, J. Surka and D. Dudits, 1991, *Euphytica*, 57:37-49.
- [37] Shen Shuxing, Zhang Chenghe, Liu Xuemin, Wang Zixin, 1998, *Acta Horticulture*, 467:113-118.
- [38] Van Tuyl JM, B. Meijer, et al., 1992, *Acta Horticulturae*, 325:625-630.
- [39] M. van Duren, R. Morpurgo, et al., 1996, *Euphytica*, 88:25-34.
- [40] Chalak L, Legave JM, 1996, *Plant Cell Reports*, 16:97-100.
- [41] Hansen AL, Gertz A, Joersbo M and Andersen SB, 1998, *Euphytica*, 101:231-237.
- [42] Jiping Zhao, Daina H. Simmonds, 1995, *Physiologia plantarum*, 95(2):304-309.
- [43] 郭启高、宋明、杨天秀、梁国鲁, 2000, 西南农业大学学报, 22(3):261-262.
- [44] Compton, Gray et al., 1999, *Tissue and Organ Culture*, 58:199-203.
- [45] Smith-MK, Hamill-SD, Langdon-PW, Pegg-KG., 1993, *Mutation-Breeding-Newsletter*, 40:4-5.
- [46] Sanford, J. C. 1983, *Ploidy manipulations*, p. 100-123. In: J. N. Moore and J. Janick (eds.). *Methods in fruit breeding*. Purdue Univ. Press, West Lafayette, Ind.
- [47] Blakeslee AF, AG avery, 1937, *J. Hered.*, 28:393-411.
- [48] Pamela S. Soltis, Douglas. E. Soltic., 2000, *PANS*. 97(13):7051-7057.
- [49] 邢少辰、蔡玉红、周开达, 2001, 吉林农业科学, 26(3):12-15.
- [50] Kuniak Sugawara, Atsushi Oowada, 1995, *Hortscience*, 30(6):1276-1278.
- [51] 宋平根、李素文, 流式细胞术的原理和应用, 1992, 北京师范大学出版社.

研究工作

不同的基质表面形貌对细胞生长行为的影响

朱邦尚 路庆华* 王宗光

(上海交通大学化学化工学院 上海 200240)

张奇巧 徐宇虹

(上海交通大学生命科学技术学院 上海 200030)

摘要 在细胞体外培养中,基质的表面形貌特征是影响细胞行为的一个重要因素。在微米尺度范围内本文研究了几种不同几何轮廓的脊/沟状形貌结构和不同间距的柱状体对鼠C6神经胶质瘤细胞生长的影响。脊/沟状形貌结构诱导细胞趋向生长,不同的几何轮廓对细胞行为的影响存在差异。柱状体间距影响细胞的贴壁和铺展,进而影响细胞的生长行为;大的间距不利于细胞生长,当间距很小时,柱状体截面的几何轮廓影响细胞的行为。

关键词: 基质 表面形貌 细胞行为 C6神经胶质瘤细胞

细胞和组织的培养通常是在培养基质如培养皿、培养板的表面进行的。在研究基质的表面特性对细胞行为的影响时,人们往往关注其表面物理化学特性如亲水/亲油性、表面能、表面电荷等,而忽略了基质表面形貌对细胞行为的影响。这是因为基质表面虽然存在着这样或那样的微结构,但由于这些微结构的大小不一且分布无序,在通常的细胞培养时很难具体地看出表面形貌对细胞行为影响的规律。直到上世纪70年代末,Clark和Curtis等把微电子的微制造技术用于制作基质表面微形貌然后观

察培养细胞的生长状况,形貌对于细胞生长影响的研究才逐步展开^[1-5]。事实上,基质的表面形貌与其表面的物理化学特性一样影响培养细胞的着附、贴壁、增殖、形态以及细胞的趋向等。本文研究了一种柱状纤维结构、两种沟槽结构(截面分别为三角形

本文2003年1月23日收到,5月4日接受。

*通讯联系人。E-mail: qhlu@sjtu.edu.cn

本研究工作受到国家自然科学基金(60087001)以及上海市科委启明星跟踪(02QME1407)和纳米专项资金(0249nm037)的资助。

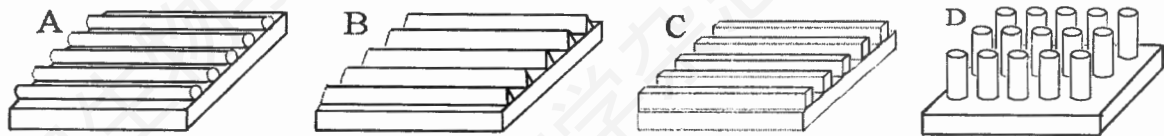


图 不同特征形貌的微结构示意图

A. 柱状纤维; B. V-形沟槽; C. 矩形沟槽; D. 柱状体阵列。

和矩形)、三种不同间距柱状结构以及柱截面几何特性对细胞生长的影响,其相应的微结构示意图如图所示。

材料和方法

1. 材料

本实验采用的基质材料为聚苯乙烯片和硅片。分布于硅片上的孔状、沟槽状微结构图母板采用电子束刻蚀法制备(由上海交通大学微纳米研究院提供)。然后,利用热模塑的方法,将这些母板的微图形转移到聚苯乙烯片上,形成与母板凹凸形貌结构相反的微结构图形;聚苯乙烯微纤,采用熔融拉丝法制备。相应的微图形尺寸大小及深度(或高度)用原子力显微镜(Nanoscope III, Digital Instruments)测定。

2. 细胞培养

神经胶质瘤细胞系——C₆细胞(上海肿瘤研究所提供)作为检测细胞模型。C₆细胞维持在含有10% (Vol/Vol) 胎牛血清(PAA, Gibco/BRL)的高糖DMEM培养基(Gibco/BRL, Bethesda, MD)中,利用其在培养瓶的传代来维持细胞系。聚苯乙烯片和硅片浸于70%的乙醇中24小时进行灭菌,然后在紫外灯下晾干。取生长状态良好的细胞用0.25%胰蛋白酶(上海思吉公司)消化后,以 1×10^4 个细胞/cm²接种于样品表面。然后置于温度为37℃和CO₂浓度为5%的培养箱中培养。

3. 细胞的固定和SEM观察

细胞培养一定的时间(24-36h)后,样品从培养箱中取出,在磷酸盐缓冲液(PBS)中轻轻漂洗两次,然后置于含有2.5%戊二醛的PBS中固定30分钟;取出后,再用PBS漂洗20分钟;接着,依次用50%、70%和95%的乙醇脱水,每次约10分钟;最后,置于干燥器中干燥。12小时后取出,用于扫描电子显微镜(SEM)观察。

由于样品不导电,样品表面必须喷金后方可用于SEM观察。实验中我们发现,用银喷镀的样品,背景干扰大,图像模糊;而用金喷镀的样品,图像清晰。因此,本实验采用99.99%的金制备样品用于SEM(S-2150, HITACHI公司)观察。

结 果

1. 不同的脊/沟状形貌微结构对细胞生长行为的影响

我们在聚苯乙烯和硅基质上选用了三种脊/沟

状形貌微结构,依次为:聚苯乙烯基质上的聚苯乙烯微纤,截面为圆,直径约11μm(见封面图A);聚苯乙烯基质上的V-形沟槽,其截面为三角形,沟槽间距为10-20μm,深度约1μm(见封面图B);硅基质上矩形沟槽,其截面为矩形,沟槽间距约为5μm,深度约0.4μm(见封面图D)。在这些三种脊/沟状形貌微结构上,可以看到细胞基本上是在脊上贴壁而不是沟中,且沿着脊/沟的长轴方向趋向生长,其胞突也相应地沿着此方向延伸;而在平面的基质上(封面图A, PS基质;封面图C, 硅基质),细胞的趋向是无序的。在PS微纤上,可以看到细胞在整个柱面都能贴壁生长,微纤能在三维方向影响细胞行为;V-形和矩形脊/沟状形貌在平面二维方向影响细胞的排列和趋向;同时,我们还发现:硅基质上细胞密度在无形貌的区域比有形貌的区域大(见封面图D中右上角插图),但这种现象在PS基质上无形貌和有形貌区域细胞密度的差异不明显。因此,对于微米尺度的脊/沟状形貌微结构,由于几何外形的不同,导致它们对同一细胞影响的差异。

2. 不同间距的柱状微结构对细胞生长的影响

我们在聚苯乙烯片上制备了三种间距不同的柱状体阵列,其高度约1.2μm,其截面为椭圆,其长轴约为4.0μm,其短轴约为3.1μm;三种柱状体阵列的间距(横向×纵向)分别为:6.1×7.2μm, 4.5×5.2μm, 1.4×1.8μm(见图版图a、b和c)。研究中发现:柱状体间距变化显著地影响细胞的生长行为,间距过大将不利于细胞贴壁生长(见图版图A);当柱状体间距减小时,将利于细胞生长,细胞密度显著增加(见图版图B);随着柱状体间距继续减小,细胞密度基本没有多大的变化,但细胞由先前的无序生长变成类似其在脊/沟上的趋向生长,部分细胞沿着柱体椭圆截面的长轴方向发生趋向(见图版图C),但细胞在其上有序性与脊/沟状形貌相比要差些。

讨 论

通过前面的实验可以看出:与平整的基质相比,基质表面形貌的变化,能显著影响细胞的生长行为。

微米尺度的脊/沟状形貌微结构能诱导细胞趋向生长,但由于脊/沟状形貌的几何轮廓的差异或曲率的不同,对细胞生长的影响也不一样;微纤和 V-形沟槽形貌从外形上类似于体内细胞外基体中的胶原蛋白纤维,因此有利于细胞的贴壁和趋向生长;相比之下,矩形沟槽形貌不利于细胞的贴壁。另外,脊/沟状形貌微结构使人为调控细胞和组织的趋向生长成为可能;对于空间三维诱导细胞趋向生长,以柱状纤维作为细胞支架较适合;对于平面二维细胞的趋向生长和排列,V-形沟槽较适合。

对于柱状体阵列,柱状体之间的间距直接影响细胞的贴壁和铺展;当柱状体间距接近或大于细胞半径时,将不利于细胞生长;当柱状体间距小于细胞半径时,细胞能较好地生长;当柱状体间距比细胞半径小得多时,柱状体的截面形状将影响细胞行为,如椭圆形状导致细胞沿椭圆长轴方向取向生长。我们认为:这种现象可能是由于微结构间距的变化影响细胞伪足的伸展和细胞的运动,从而影响细胞的贴壁、铺展和细胞的其他行为。同时,与柱状体阵列相对应的微孔阵列的间距,也可能影响细胞的行为,我们将在以后进一步的研究中探讨。

了解不同形貌特征的微结构对细胞生长行为的影响具有重要的现实意义。如在细胞和组织工程领域,可用于指导细胞培养支架的设计,细胞和组织的定向生长;在医疗领域,可用于指导植入体材料的表面形貌设计,以减小人体的排异性;在功能器件领域,有序排列的细胞可有望用于生物传感器的研究和开发。

图版说明

(图版见本期封面)

不同基质和表面形貌几何外形的差异对细胞生长行为的影响

A. PS 基质和其上的 PS 微纤; B. PS 基质上的 V-形脊/沟形貌; C. 硅平面; D. 硅基质上的矩形脊/沟形貌。

参考文献

- [1] Curtis, A. S. G., Varde, M., 1964, *J. Natl. Cancer Res. Inst.* **33**:15-26.
- [2] Clark, P., Connolly, P., and Curtis, A. S. G., et al., 1987, *Development*, **99**: 439-448.
- [3] Clark, P., Connolly, P., and Curtis, A. S. G., et al., 1990, *Development*, **108**: 635-664.
- [4] Curtis, A., and Wilkinson, C., 1997, *Biomaterials*, **18**: 1573-1582.
- [5] Clark, P., 1994, *Bioelec.*, **9**: 657-661.

THE EFFECTS OF VARIOUS SUBSTRATE SURFACE TOPOGRAPHY ON CELL BEHAVIOR

ZHU Bang Shang LU Qin Hua** WANG Zong Guang

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai Jiaotong University Shanghai 200240)

ZHANG Qi Qiao, XU Yu Hong

(School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University Shanghai 200030)

ABSTRACT Topography cue is one of the important factors that affect cell behavior in vitro. The influence of various substrate topography at micrometer scale including ridges/grooves, which have different geometrical profile and different spaces in between pillars, on rat C6 glioma cell was investigated. In comparison to plane, ridges inclined to guide cell orientation and the geometrical profile of ridges/grooves played a vital role on this effect. Also the space between pillars affected cell attachment and spread, as well as pillar profile on cell orientation.

Key words: Substrate Surface topography Cell behavior C6 glioma cell

* This work is founded by the National Natural Science Foundation of China (No. 60087001), the Science and Technology Commission of Shanghai Municipal Government (Qi Ming Xin Gen Zong (No. 02QME14107), and Nano Special Foundation (No. 0249nm037)).

** Corresponding author. E-mail: qhlu@sjtu.edu.cn