技术与方法

不同孔径的纳米多孔氧化铝膜对细胞迁移的影响

安郁宽¹ 闫 鹏¹ 徐艳岩²* ('滨州医学院基础学院,烟台 264003; ²滨州医学院药学院,烟台 264003)

摘要 为了研究不同孔径的纳米多孔阳极氧化铝膜对细胞迁移的影响,采用扫描电镜和X射 线能谱仪分别检测不同孔径纳米氧化铝膜微观结构与元素组成;将Hela细胞常规培养于激光共聚焦 四内,分为对照组、40~70 nm孔径组和200~300 nm孔径组三组,进行划痕实验;将皿放入活细胞工 作站随机选取多个观测点,连续观测24 h;从迁移面积、边缘迁移距离和单细胞迁移速度等方面进 行细胞迁移分析;用扫描电镜对细胞在两种膜上生长24 h后的情况进行观测。结果显示,40~70 nm 孔径组与对照组相比可加快细胞迁移(P<0.05),200~300 nm孔径组与对照组相比可减缓细胞迁移 (P<0.05)。该研究结果表明,纳米氧化铝膜的孔径不同对细胞迁移影响不同,这为临床研究中控制 细胞行为材料的设计和研发提供了实验依据。

关键词 纳米多孔阳极氧化铝膜;活细胞工作站;细胞迁移;划痕实验

The Effect of the Nanoporous Alumina Films with Different Pore Diameters on the Cell Migration

An Yukuan¹, Yan Peng¹, Xu Yanyan^{2*}

(¹College of Basic Sciences, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China; ²College of Pharmacy, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China)

Abstract To investigate the effects of the nanoporous anodic alumina (NAA) films with different pore diameters on the Hela cells migration, the Scanning Electron Microscope (SEM) and the Energy Dispersive X-ray Spectroscopy were used to characterize the microcosmic structure and chemical components of the NAA films respectively. The Hela cells were cultured in confocal dishes, divided into three groups (control group, 40-70 nm pore diameter group and 200-300 nm pore diameter group), to perform wound healing assay, randomly picked several observing points to observe 24 hours continuously in the live cell imaging system. The cell migration analysis was performed in terms of migration area, migration distance of the edge and migration speed of single cell. The growth status of the cells after cultured 24 hours on both films was characterized by the SEM. The results showed that the 40-70 nm pore diameter group was able to speed the cell migration compared to the control group (P < 0.05), while the 200-300 nm pore diameter group was slower (P < 0.05). These data suggested that the NAA films with defferent pore sizes had different effects on the cell migration, which might provide the evidence for the design, study and development of the materials controlling cell behavior in the clinical research.

Keywords nanoporous anodic alumina film; live cell imaging system; cell migration; wound healing assay

Received: May 4, 2017 Accepted: June 8, 2017

收稿日期: 2017-05-04 接受日期: 2017-06-08

山东科技发展计划(政策引导类)(批准号: 2011YD02094)和国家自然科学基金(批准号: 51401031)资助的课题

^{*}通讯作者。Tel: 0535-6913225, E-mail: bzmcxyy@126.com

This work was supported by the Science and Technology Development Program of Shandong Province (Grant No.2011YD2094) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.51401031)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-535-6913225, E-mail: bzmcxyy@126.com

网络出版时间: 2017-07-24 11:25:41 URL: http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170724.1125.004.html

细胞迁移是细胞的基本功能之一,是活细胞普遍 存在的一种运动形式。细胞迁移过程受大量的化学 和物理信号的指导。特定表面形貌的纳米结构可以 用于控制肿瘤细胞的增殖和迁移。纳米多孔氧化铝 膜具有良好的生物相容性,在以肿瘤治疗为目标的多 功能药物载体系统等方面具有重要的应用价值^[1]。如 果纳米多孔氧化铝膜的微观表面形貌存在一定的差 异,则这些材料表面对蛋白质的吸附能力也会随之改 变,这就为控制细胞行为提供了发展空间^[2-3]。研究表 明,影响细胞迁移行为的因素包括纳米孔径的大小、 空间和深度等^[4]。在不同的微观结构和力学强度的基 质上,细胞迁移速度和迁移方向会随之改变^[5]。

目前, 检测细胞迁移能力主要有细胞划痕实验[67] 和Transwell小室迁移实验^[6-7]两种方法。但是, 传统 的细胞划痕实验不能确定每次观察的都是同一位 点,对结果无法进行定量分析,对于划痕内出现的细 胞是迁移还是增殖而来无法区分^[8];而Transwell小 室迁移实验能定量分析,但不能直观观测细胞迁移 的过程,也不能区分细胞迁移和细胞增殖^[9]。活细 胞工作站具有电脑可控的全自动倒置显微镜和配合 载物台使用的细胞培养装置[10],既可以提供自由的 多维活细胞图像采集、控制、分析等强大功能,又 可以充分保证整个活细胞采集过程中的光学、电学、 温度、pH值等多个条件的高度协调和稳定,并且可 以在活细胞工作站拍摄过程中保持高清晰、高反差 和高速度的成像效果[10],这恰好弥补了传统的细胞 划痕实验和Transwell小室迁移实验的不足。本研究 利用活细胞工作站研究了不同孔径的纳米多孔阳极 氧化铝膜对细胞迁移行为的影响,为肿瘤细胞转移、 皮肤移植等研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

标称值分别为40~70 nm和200~300 nm孔径的 纳米多孔阳极氧化铝膜购自合肥普元纳米科技公 司; 宫颈癌Hela细胞为本实验室保存; RTMI-1640培 养基购自赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司; 无支原体胎牛血清为四季青(浙江天杭生物科技有 限公司)产品; 胰蛋白酶为Hyclone产品。

1.2 仪器

活细胞工作站(DV Elite)购自美国API公司,分 析软件为Softworx; 倒置显微镜(CKX41SF)购自日 本Philippines公司; 扫描电镜(EVOLS15)购自德国卡尔蔡司公司; X射线能谱分析仪(LINK-ISIS300)购自 英国牛津公司; 离心机(TDZ4-WS)购自长沙湘智离 心机仪器有限公司; CO2培养箱(D-63450)购自德国 Hanau公司; 洁净工作台(SW-CJ-2FD购自苏净集团 苏州安泰空气技术有限公司。

1.3 细胞传代培养

Hela细胞在含10% FBS、100 U/mL青霉素、 100 U/mL链霉素的RTMI-1640培养基中培养,于37 ℃、 5% CO₂及饱和湿度条件下常规传代培养(无菌操作)。

1.4 纳米多孔氧化铝膜表征及能谱分析

对40~70 nm、200~300 nm两种不同孔径的纳 米氧化铝膜进行表面形貌的扫描电镜观察。采用 EDS能谱分析两种膜的元素组成。

1.5 划痕实验及活细胞工作站观测

实验分3组: 对照组、40~70 nm孔径组和200~ 300 nm孔径组。取对数期细胞, 调整细胞浓度为 1×10⁵/mL, 接种于激光共聚焦皿中, 每皿2 mL。其 中, 对照组直接接种于皿底玻璃上, 另外两组则接 种于相应的纳米膜上。置于37 ℃、5% CO₂的细 胞培养箱中, 恒温孵育24 h。第2 d待细胞铺满皿底 80%~90%, 用10 μL的枪头划3条平行的直线, PBS洗 涤3次, 弃悬浮细胞, 然后用含5% FBS的RTMI-1640 培养孵育, 放入活细胞工作站中, 随机选取多个点进 行观测, 每隔15 min采集图像一次, 持续采集24 h。

1.6 数据分析

采集的序列图像数据用活细胞工作站自带软件Softworx以及软件Image-Pro Plus 6.0进行分析。 1.6.1 检测单细胞迁移速度 选择未分裂细胞,用活细胞工作站自带的Softworx软件测量其从0~n h的迁移距离,计算其迁移速度。迁移速度=迁移距离/时

江移距离, 日昇共江移速度。江移速度=江移距离, 可 间。图1为用Image-Pro Plus 6.0软件描记的划痕边缘 上的单个细胞在0~24 h内的迁移轨迹, 右上角虚线 框内为局部放大图像。其中, 迁移距离是指终点到 起点的直线距离。

1.6.2 检测边缘迁移距离 用Image-Pro Plus 6.0软件在0h图像的划痕两个边缘、沿着垂直于划痕方向上各取一点,测量0h边缘距离,如图2A。同样,在nh图像的对应位置测量nh边缘距离,如图2B。则计算式为:nh迁移距离=0h边缘距离_nh边缘距离。在划痕的边缘沿着划痕方向均匀地选取25个点,测量边缘迁移距离,测量结果直接导出到Excel处理。

1.6.3 检测迁移面积 用Image-Pro Plus 6.0测量出
0 h的空白面积(图3A)和n h的空白面积(图3B)。则计
算公式为: n h迁移面积=0 h空白面积-n h空白面积。



图1 Hela细胞24 h内的单细胞迁移轨迹 Fig.1 Migration trace of a single Hela cell in 24 hours

1.7 扫描电镜细胞观察

活细胞工作站细胞培养24 h后,弃去培养液,用 0.1 mol/L磷酸缓冲液冲洗3~4次,加入2.5%的戊二醛 溶液固定细胞,在4 ℃冰箱中放置24 h。24 h后将所 固定细胞充分洗净后用乙醇梯度上升脱水,每级各 10 min,临界点干燥。将已干燥好的样品分成6~7份, 用导电胶将样品粘于金属样台上,正面侧面各3~4 份,扫描电镜观察、拍照。

1.8 统计学分析

数据均用x±s表示,组间显著性检验用样本方差进行比较,采用t检验进行组间两两比较,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纳米多孔氧化铝膜表征

图4为两种孔径的纳米多孔氧化铝膜的扫描电



A: 0 h边缘距离; B: 24 h边缘距离。 A: edge distance at 0 h; B: edge distance at 24 h.





A: 0 h空白面积; B: 24 h空白面积。 A: blank area at 0 h; B: blank area at 24 h.

图3 Hela细胞迁移面积的测量 Fig.3 Measurement of Hela cell migration area

镜照片。其中,图4A、图4B为40~70 nm孔径纳米膜的正面、侧面照片,图4C、图4D为200~300 nm孔径纳米膜的正面、侧面照片。

两种纳米膜的实际孔径用Image-Pro Plus 6.0软件测量,在两膜上各选取30个孔,分别测量其面积S, 然后根据圆的面积公式S=nd²/4,计算出其等效的圆孔 径d,表1为两孔径的测量结果。由表1可见,40~70 nm 膜的平均孔径实际测量约为58 nm, 200~300 nm膜的 平均孔径实际测量约为261 nm。

2.2 能谱分析

采用X射线能谱分析仪对两种纳米多孔氧化铝 膜进行元素分析,图5A、图5B分别为40~70 nm和 200~300 nm孔径纳米膜的EDS谱。两种能谱中都有 氧元素和铝元素两个高峰,几个微小峰的峰位也相



A: 40~70 nm正面; B: 40~70 nm侧面; C: 200~300 nm正面; D: 200~300 nm侧面。

A: obverse side of 40-70 nm; B: cross-section of 40-70 nm; C: obverse side of 200-300 nm; D: cross-section of 200-300 nm. 图4 两种纳米多孔氧化铝膜正面、侧面扫描电镜照片



	Table 1	The area (S) and diam	neter (<i>d</i>) of both NAA films
	膜	面积(S)(nm ²)	孔径(d)(nm)
	Films	Area (S)(nm ²)	Diameter $(d)(nm)$
-	40-70 nm	(2.77±0.89)×10 ³	58±11
	200-300 nm	(5.60±2.10)×10 ⁴	261±62
(A	A) AI		(B) Al
0	.5 1.0 1.5 2.0	2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 keV	0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 keV

	表1	Ē	两种氧	化铝膜上	的约	内米子	礼的	面积	?(S)	和孔	孔谷	<u>z</u> (a	l)
_										-			-

A: 40~70 nm膜; B: 200~300 nm膜。

A: 40-70 nm film; B: 200-300 nm film.



同。可见,大小两种孔径的纳米多孔氧化铝膜表面 化学元素的组成无明显差异。

2.3 活细胞工作站检测纳米多孔氧化铝膜对细胞 迁移能力的影响

在激光共聚焦皿底做划痕后,在活细胞工作 站随机选取观测点连续观察24 h,细胞生长状态良 好,划痕逐渐愈合,不同时间点拍摄的图像均视野 稳定,焦点未飘移。采集的序列图像数据用活细胞 工作站自带软件Softworx和Image-Pro Plus 6.0进 行分析。

2.3.1 单细胞迁移速度 如图6所示, 40~70 nm 孔径组在6、12、24 h单细胞迁移速度均比对照组 要快(P<0.05), 200~300 nm孔径组与对照组相比 在6、12、24 h均可减缓单个Hela细胞的迁移速度 (P<0.05)。40~70 nm孔径组和对照组的单细胞迁移 速度均比200~300 nm孔径组快(P<0.01)。

2.3.2 边缘迁移距离 如图7所示, 40~70 nm孔 径组边缘迁移距离与对照组相比在6 h无明显差 异(P>0.05),在12 h、24 h均有明显增加(P<0.05); 200~300 nm孔径组边缘迁移距离与对照组相比均明 显减小(6 h, P<0.05; 12 h、24 h, P<0.01); 40~70 nm孔 径组在6、12、24 h的边缘迁移距离明显大于200~ 300 nm孔径组(P<0.01)。

2.3.3 活细胞工作站检测迁移面积 如图8所示,
40~70 nm孔径组与对照组相比在6h无明显区别 (P>0.05), 而在12h、24h均可以增加Hela细胞的迁移面积(P<0.05); 200~300 nm孔径组与对照组相比 在6、12、24h均减小Hela细胞的迁移面积(P<0.05);
40~70 nm孔径组迁移面积均明显大于200~300 nm孔径组(6h, P<0.05; 12h、24h, P<0.01)。

2.4 细胞形态学观察

细胞培养24 h后,将激光共聚焦皿里的纳米 多孔氧化铝膜弃去培养液,进行清洗、固定等处 理,扫描电镜结果如图9所示。其中图9A、图9B为 40~70 nm孔径组的正面、侧面图像,图9C、图9D为 200~300 nm孔径组正面、侧面图像。

从图9A中可以看出,40~70 nm孔径氧化铝膜上 生长的细胞形态为扁梭型,细丝状伪足伸展的较少。 由图9B侧面图可看出,细胞形成的细丝状伪足并没 有深入伸展到纳米孔洞中;200~300 nm孔径氧化铝 膜上生长的细胞与材料表面接触非常紧密,细胞形 态不规则,呈扁平状,有大量细丝状的伪足伸出并黏



*P<0.05, 与对照组相比; [▲]P<0.01, 与200~300 nm孔径组相比。
 *P<0.05 vs control group; [▲]P<0.01 vs 200-300 nm group.
 图6 纳米多孔氧化铝膜对单细胞迁移速度的影响
 Fig.6 The effects of the NAA films on single

cell migration velocity





migration distance







A: 40~70 nm正面, 箭头所指为伪足; B: 40~70 nm侧面, 箭头所指无伪足伸入纳米孔; C: 200~300 nm正面, 箭头所指为伪足; D: 200~300 nm侧面, 箭头所指为伸入到纳米孔内的伪足。

A: obverse side of 40-70 nm, arrow points at the protrusion; B: cross-section of 40-70 nm, arrow indicates no protrusion; C: obverse side of 200-300 nm, arrow points at protrusions; D: cross-section of 200-300 nm, arrow indicates the protrusion that extent into the nanopore.

图9 Hela细胞在两种氧化铝膜表面培养24 h后的扫描电镜图像

Fig.9 Morphology of Hela cells cultured on both NAA films for 24 hours under SEM

附在纳米材料表面(图9C)。由图9D侧面图可以看出, 细胞的很多细丝状伪足伸入到纳米孔洞内,形成锚 状结构,牢固地黏附于膜表面。

3 讨论

目前,细胞迁移由于其独有的运动特性成为细胞特性的研究内容之一,血管生成、伤口愈合、炎症反应、癌症转移等过程中都涉及细胞迁移。细胞迁移为细胞头端伪足的延伸、与细胞外基质建立新的黏附、细胞体尾端缩回在时空上的交替过程。丝状伪足有助于细胞对周围环境的适应及确定细胞迁移的方向。本研究采用X射线能谱分析仪对两种纳米多孔氧化铝膜进行元素分析,两种膜的EDS谱可见大、小两种孔径的纳米多孔氧化铝膜表面化学元素的组成无明显差异,因此,样品对细胞的生长及迁移的影响不是由于材料表面化学成分不同造成的。两种膜的扫描电镜结果显示,不同孔径的氧化铝膜的表面成分、粗糙程度、表面图形等实验参数基本一致,即上述因素不构成对细胞迁移的影响。

由活细胞工作站的结果可以看出,200~300 nm氧 化铝膜上细胞的细丝状伪足伸入到大孔径的的纳米 级孔洞内,此生物学黏附的细胞比较牢固,在一定程度上影响了细胞的迁移。因此,细胞在200~300 nm氧化铝膜的突触生长情况比40~70 nm孔径的要多而牢固,细胞在200~300 nm孔径的纳米氧化铝膜上迁移比在40~70 nm孔径的慢;在40~70 nm孔径氧化铝膜上生长的细胞伪足不能伸入到孔洞深处,然而,由于材料表面的纳米孔洞增加了细胞伪足的黏附能力,加快了细胞的迁移速度。

不同孔径的纳米多孔氧化铝膜对细胞迁移的影响是不同的,纳米多孔氧化铝膜表面的纳米孔洞的 直径大小可显著影响Hela细胞的迁移。40~70 nm孔 径氧化铝膜较对照组加快了细胞的迁移过程,200~ 300 nm孔径氧化铝膜与对照组相比可以减缓Hela细 胞的迁移过程,40~70 nm孔径氧化铝膜上的细胞迁 移比200~300 nm孔径氧化铝膜快,在迁移面积、边 缘迁移距离、单细胞迁移速度三个指标上的结果基 本一致。这提示,氧化铝薄膜可以用于组织工程中 的细胞培育。目前,已有文献报道了多孔氧化铝基 膜材料作为支架用来控制细胞的相互作用^[11-12]。

本研究结果提示,纳米多孔氧化铝膜孔径不同 对细胞迁移的影响也不相同,可根据此结论制作不 同纳米孔径的可降解材料,以便在临床上达到抑制

肿瘤细胞转移或促进正常细胞生长的目的。

参考文献 (References)

- 姜菁菁, 郭 超, 谭永宜. 从文献分析看纳米载药技术领域的发展重点. 山东化工(Jiang Jingjing, Guo Chao, Tan Yongyi. Major development in drug nanocarriers based on documents analysis. Shandong Chemical Industry) 2016; 45(5): 49-52.
- 2 安郁宽,秦丹,徐艳岩.不同孔径纳米氧化铝膜的表征及其 对U251细胞形态的影响.材料导报B:研究篇(An Yukuan, Qin Dan, Xu Yanyan. The characterization of nano-alumina films with various pore sizes and their effect on the morphology of the U251 cells. Materials Review B: Research) 2015; 29(7): 36-9.
- 3 倪似愚,张燕飞,倪世容. 直径可控阳极氧化铝表面有序纳米 孔阵列对脐静脉内皮细胞黏附行为的影响. 中国组织工程研 究(Ni Siyu, Zhang Yanfei, Ni Shirong. Ordered nanopore arrays on the surface of diameter-controlled anodic alumina influence the adhesion behavior of umbilical vein endothelial cells. Chinese Journal of Tissue Engineering Research) 2012; 16(29): 5336-40.
- 4 Thakur S, Massou S, Benoliel AM, Bongrand P, Hanbucken M, Sengupta K. Depth matters: Cells grown on nano-porous anodic alumina respond to pore depth. Nanotechnology 2012; 23(25): 255101-6.
- 5 Lutolf MP, Gilbert PM, Blau HM. Designing materials to direct stem-cell fate. Nature 2009; 462(7272): 433-41.
- 6 王金淼,姜涛,戚峰,刘彤,王鹏志.抑制microRNA-21表达 降低HCT-116细胞侵袭转移能力的实验研究.天津医科大学学 报(Wang Jinmiao, Jiang Tao, Qi Feng, Liu Tong, Wang Pengzhi. Experimental research on reducing invasion and metastasis ability of HCT-116 by inhibiting microRNA-21expression.

Journal of Tianjin Medical University) 2016; 22(1): 13-6.

- 7 黄 荷,张 勇,杨舒婷,符晓华. DFMG调节TLR-4抑制损伤内 皮细胞对平滑肌细胞增殖和迁移促进作用. 湖南师范大学学 报(医学版)(Huang He, Zhang Yong, Yang Shuting, Fu Xiaohua. DFMG inhibited proliferation and migration of smooth muscle cells ttimulated by LPC-induced injured endothelial cells through depressing TLR4. Journal of Hunan Normal University, Medical Sciences) 2016; 13(1): 1-5.
- 8 胡剑江, 雷洪涛, 侯燕鸣. 肿瘤细胞迁移过程的动态评估方法. 中国药理学通报(Hu Jianjiang, Lei Hongtao, Hou Yanming, Wang Yi. A new evaluation method for tumor cell migration process. Chinese Pharmacological Bulletin) 2010; 26(1): 128-31.
- 9 刘雯婷, 陈红梅, 聂富强. 基于微流控芯片的细胞迁移. 科学 通报(Liu Wenting, Chen Hongmei, Nie Fuqiang. Cell migration with microfluidic chips. Chinese Science Bulletin) 2016; 26(3): 364-73.
- 10 徐晓静,张焕相.活细胞工作站实时摄影技术在间充质干 细胞迁移实验中的应用.实验室科学(Xu Xiaojing, Zhang Huanxiang. Application of live cell imaging system in real-time observation of mesenchymal stem cell migration. Laboratory Science) 2013; 16(5): 22-8.
- 11 吴天琦,杨春喜.可用于骨修复的3-D打印多孔支架研究进展.中国修复重建外科杂志(Wu Tianqi, Yang Chunxi. Research progress of three-dimensional printing porous scaffolds for bone tissue engineering. Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery) 2016; 30(4): 509-13.
- 12 杨 慧,丁 良,岳志莲. 纳米生物技术在医学中的应用. 生物技术 通报(Yang Hui, Ding Liang, Yue Zhilian. The application of nanobiotechnology in medicine. Biotechnology Bulletin) 2016; 32(1): 49-57.