

氧等离子体硫化法制作可变形聚二甲基硅氧烷 薄膜培养基底

张毅奕 陶祖莱

(中科院力学所 国家微重力实验室,北京 100080)

摘要 发展了氧等离子体硫化法制作可变形聚二甲基硅氧烷薄膜培养基底的技术。与传统的加热硫化法相比,该法制作的基底表面具有亲水性,细胞的黏附、铺展以及基底皱褶变形的发展均非常迅速。此外,观察了细胞松弛素 D 处理过程中基底皱褶的变化,结果表明这种技术具有较高的时间分辨率。

关键词 氧等离子体 聚二甲基硅氧烷 可变形基底 细胞

Oxygen Plasma-vulcanized Deformable Polydimethylsiloxane Sheet Culture Substrates

Zhang Yiyi Tao Zulai

(National Microgravity Laboratory, Institute of Mechanics, CAS, Beijing 100080)

Abstract A method of preparing deformable polydimethylsiloxane sheet culture substrates by oxygen plasma vulcanization was developed. As compared with the traditional heating vulcanization method, the substrates prepared in this way have hydrophilic surfaces, the adhesion and spreading of cells both occur quickly, and the wrinkling deformation of substrates develops quickly, too. In addition, the changes of wrinkles during treatment of cytochalasin D were observed, and the result shows that this technique has high temporal resolution.

Key words Oxygen plasma Polydimethylsiloxane Deformable substrate Cell

1 引言

除了化学的相互作用如配体和受体的结合以外,细胞与基底之间也存在力的相互作用^[1]。后者不仅与细胞的运动、迁移有关^[2~4],还广泛参与细胞各种生理活动的调节,如分化、增殖和基因表达等^[5,6]。因此,相关的研究在基础理论和临床应用上均有重要的意义。

聚二甲基硅氧烷薄膜培养基底(以下简称硅胶薄膜基底)是研究细胞-基底力学相互作用的重要工具。此类基底很薄($\sim 1 \mu\text{m}$)^[7],且刚度很低(10^{-2} N/m 量级)^[8],细胞可使其产生显著的皱褶变形。根据皱褶的长短和方向,即可直观地推断细胞作用在基底上的力的大小和方向。制作硅胶薄膜基底的方法最早由 Harris 等^[7,9]发展,即加热硫化法。该法目前仍在沿用,简言之,以酒精喷灯短暂加热(1~1.5 s)涂布在玻片上的聚二甲基硅氧烷液滴,液滴表面即可硫化形成聚二甲基硅氧烷薄膜。

加热硫化法存在一些内在的缺陷,主要源自于聚二甲基硅氧烷特殊的表面化学性质,即疏水性(水接触角约 100°)、低临界表面张力($21 \sim 22 \text{ mN/m}$)^[10]以及低表面自由能(21.6 mJ/m^2)^[11]。这些特性可对细胞-基底力学相互作用造成不利影响^[12],表现为细胞的黏附铺展以及基底皱褶变形的发展均十分缓慢(约 1 d)^[13]。此外,由于其疏水性,操作过程中基底不能暴露于气液界面,否则细胞会迅速脱水死亡,基底也会被液体的表面张力撕裂^[13],给日常操作带来了很大的不便。

为了解决这些问题,我们发展了氧等离子体硫化法。该法制作的硅胶薄膜基底具有亲水性,因此日常操作十分简单。此外,细胞的黏附铺展和皱褶变形发展的也十分迅速。

2 材料和方法

2.1 氧等离子体发生装置

我们所用的氧等离子体发生装置系由中科院科

仪厂生产的小型离子溅射仪(SBC-12)改装而成,具体改装方法将另文报道。简言之,在原样品台上方架置一玻片,该玻片可以遮挡溅射落下的靶材,而玻片下方依然存在较弱的氧等离子体,可对样品表面进行处理。

2.2 可变形硅胶基底制作

在干净盖玻片上滴加 1 滴(约 $5 \mu\text{l}$)聚二甲基硅氧烷(Sylgard 184, Dow Corning),静置 15 min 待其铺展开后,转入等离子体发生装置内,通以高纯氧,10 mA 氧等离子体处理 40 s。经此处理后,聚二甲基硅氧烷液滴表面即可形成一层聚合薄膜。75%乙醇浸泡消毒,超净台上吹干,即可用于接种细胞。

2.3 基底表面亲水性

以加热硫化法和氧等离子体硫化法分别制作硅胶薄膜基底,在其表面上滴加 $3 \mu\text{l}$ 水,显微镜下观察水滴形状及水的表面张力造成的基底变形。

2.4 细胞黏附铺展及基底皱褶的发展

人成纤维细胞购自北京百灵克生物技术公司,培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,取对数生长期细胞接种于硅胶薄膜基底。观察细胞黏附铺展和基底皱褶发展的速度。所有培养用液均购自 HyClone 公司。

2.5 基底皱褶的动态变化

以 $2 \mu\text{M}$ 细胞松弛素 D 处理培养在硅胶薄膜基底上的人成纤维细胞,观察基底皱褶变形的动态变化过程。

3 结果

3.1 硅胶薄膜基底制作

图 1 是氧等离子体硫化法制作的硅胶薄膜基底。薄膜边缘与盖玻片牢固结合,而薄膜下方仍为液

态聚二甲基硅氧烷。为便于观看,采用侧光照明,实际样品为无色透明。

3.2 基底表面亲水性

加热硫化法制作的硅胶薄膜基底上滴加 $3 \mu\text{l}$ 水后,水滴呈球状。在水滴边缘处,由于水的表面张力的作用,基底产生辐射状皱褶变形。氧等离子体硫化基底上,水滴自发铺展,基底表面无任何变形。表明两种基底分别具有疏水性和亲水性(见图 2)。

3.3 细胞黏附铺展及基底皱褶的发展

常规细胞培养皿表面接种细胞后,细胞通常在 1 h 内即可黏附并逐渐铺展,而在加热硫化法制作的硅胶薄膜基底上则需 1 d 左右的时间^[12],表明其黏附性很差。氧等离子体硫化的硅胶薄膜基底的黏附性与常规细胞培养皿近似。如图 3 所示,人成纤维细胞接种后 40 min 已经黏附(A),并于 2 h 内充分铺展(B)。基底皱褶的发展与此同步,在细胞已黏附但尚未充分铺展前,基底上已产生明显可见的皱褶(A),而当细胞充分铺展后,基底皱褶变形也得以充分发展(B)。

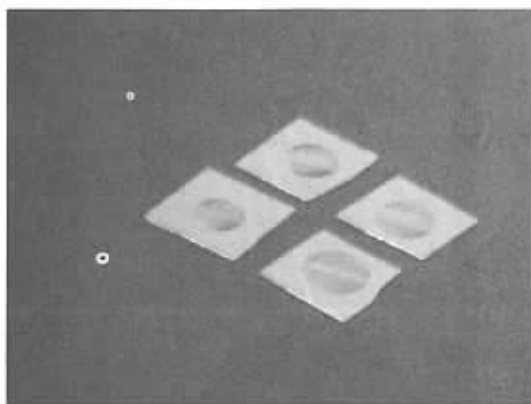


图 1 氧等离子体硫化的硅胶薄膜基底

Fig 1 Oxygen plasma-vulcanized silicone sheet substrates

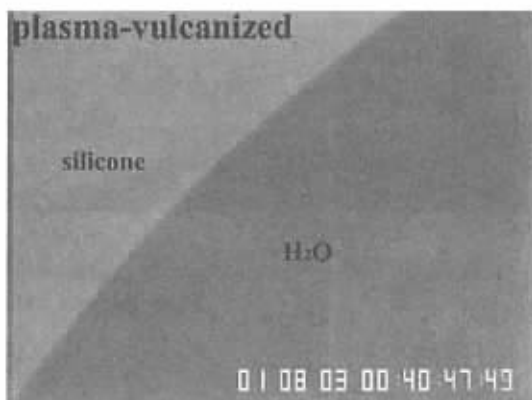
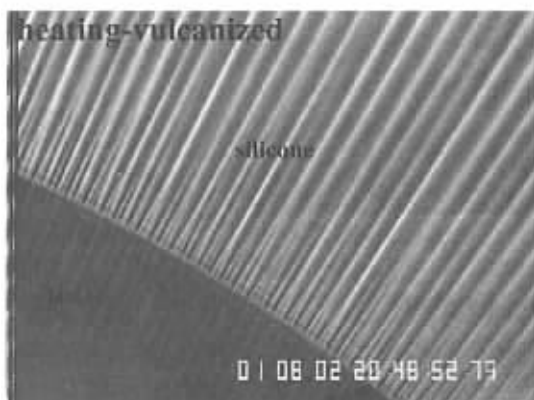


图 2 表面亲水性比较

Fig 2 Comparison of surface hydrophilicity

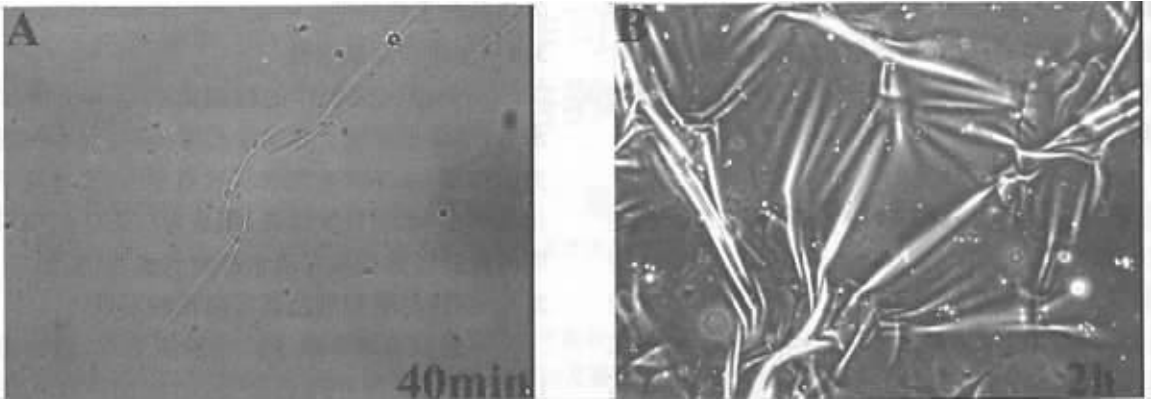


图 3 培养在氧等离子体硫化的硅胶薄膜基底上的人成纤维细胞

Fig 3 Human fibroblasts cultured on oxygen plasma- vulcanized silicone sheet substrates

3.4 基底皱褶的动态变化

如图 4 所示,以细胞松弛素 D 处理培养在硅胶

薄膜基底上的人成纤维细胞,基底的皱褶变形随着处理时间的延长迅速松弛,具有良好的时间分辨率。

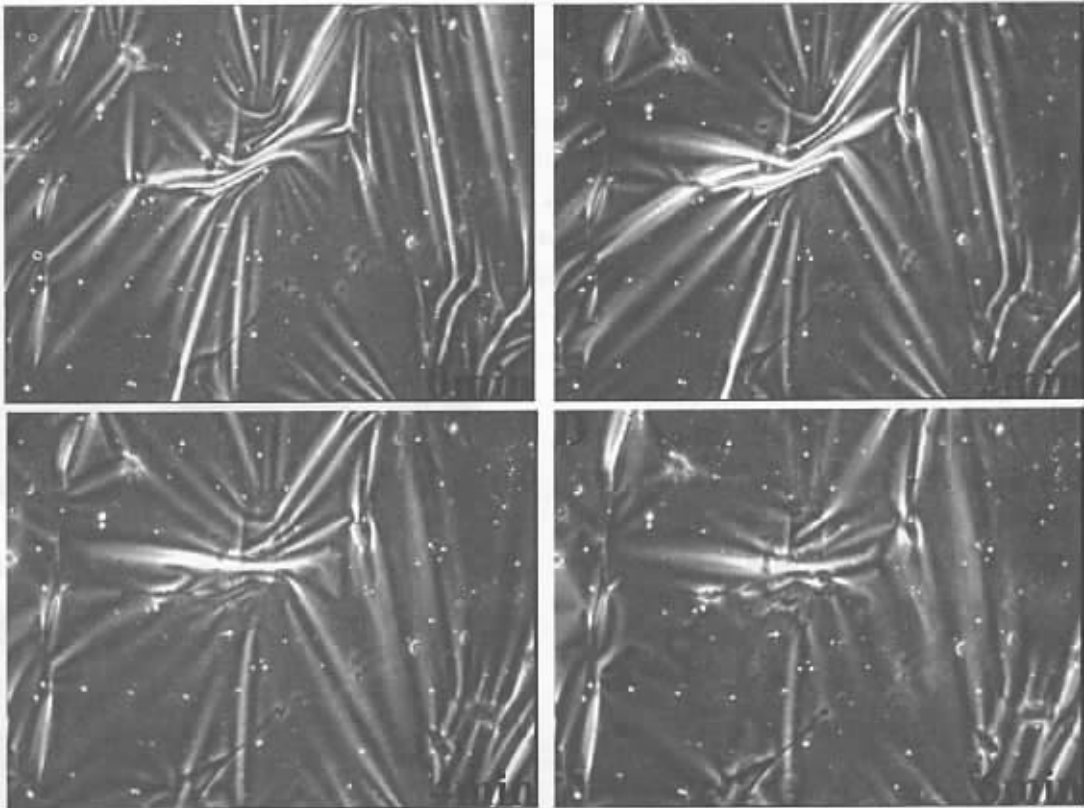


图 4 基底皱褶的动态变化

Fig 4 Dynamic variation of substrate wrinkles

4 讨论

加热硫化法制作的硅胶薄膜基底,由于其表面自由能和临界表面张力很低,蛋白质在其表面上较难吸附^[14],而细胞在表面上的黏附铺展又取决于胞

外基质蛋白吸附层的存在,因而加热硫化硅胶薄膜基底上细胞的黏附和铺展十分缓慢。此外,硅胶薄膜基底表面化学基团为甲基,故此具有疏水性,这一点为日常操作带来了很大的不便。考虑到氧等离子体具有很高的反应活性^[15,16],且可在聚二甲基硅氧烷

表面上引入羟基^[11],我们设想也许可以利用氧等离子体制具有更好表面化学性质的硅胶薄膜基底,以克服加热硫化法的内在缺陷。实验结果表明,我们的设想确实可行。氧等离子体硫化的硅胶薄膜基底不仅具有良好的亲水性,而且其表面上细胞的黏附铺展及皱褶变形的发展均远快于加热硫化的硅胶薄膜基底。其原因可能是表面羟基的引入增高了表面自由能和临界表面张力,有利于胞外基质蛋白的吸附。此外,硅胶薄膜基底上的皱褶变化具有较高的时间分辨率,适于观测细胞-基底力学相互作用的动态变化过程。

参 考 文 献

- 1 Pelham RJ, Wang YL. High resolution detection of mechanical forces exerted by locomoting fibroblasts on the substrates. *Mol Biol Cell*, 1999; 10 : 935
- 2 Oliver T, Dembo M, Jacobson K. Traction forces exerted by locomoting cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1995; 31 : 225
- 3 Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 1996; 84 : 359
- 4 Pelham RJ, Wang YL. Cell locomotion and focal adhesion are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; 94 : 13661
- 5 Chicurel ME, Chen CS, Ingber DE. Cellular control lies in balance of forces. *Curr Opin Cell Biol*, 1998; 10 : 232
- 6 Ingber DE. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu Rev Physiol*, 1997; 59 : 575
- 7 Harris AK, Wild P, Stopak D. Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science*, 1980; 208 : 177
- 8 Lee J, Leonard M, Oliver T, *et al.* Traction forces generated by locomoting keratocytes. *J Cell Biol*, 1994; 127 : 1957
- 9 Harris AK, Stopak D, Wild P. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature*, 1981; 290 : 249
- 10 Kricheldorf HR. Silicone in polymer synthesis. Springer-Verlag Press. Reprinted by Beijing World Publishing Corporation, 1998; 122
- 11 Xia YN, Whitesides GM. Soft lithography. *Angew Chem Int*, 1998; 37 : 550
- 12 Harris AK. Fibroblasts and myoblasts. *Methods Enzymol*, 1988; 163 : 623
- 13 Harris AK. Tissue culture cells on deformable substrata: Biomechanical implications. *J Biomed Eng*, 1984; 106 : 19
- 14 Wahlgren M, Arnebrant T. Protein adsorption to solid surfaces. TIBTECH, 1991; 9 : 201
- 15 Yu Yaoting. Biomedical material. Press of Tianjin University, 2000; 224. [俞耀庭主编. 生物医用材料. 天津大学出版社, 2000; 224]
- 16 Yang Zibin. Biomedical Engineering. Heilongjiang Science and Technology Press, 2000; 357 [杨子彬主编. 生物医学工程学. 黑龙江科学技术出版社, 2000; 357]

(收稿:2002-07-09)