文章编号:1000-5404(2006)19-1927-04

论著

流动腔底面上内皮细胞图型化方法的初步研究

张 莉[1,2],韩亚刚[1,3],蒋稼欢[1],蔡绍皙[1] (重庆大学:[1]生物工程学院,生物力学与组织工程教育部重点实验室,[3]电气工程学院,重庆 400044;[2]第三军医大学医学检验系分析化学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 体外模拟动脉粥样硬化好发部位复杂的血液流动状态,在流动腔底部形成微图型化的细胞,以获取单个细胞或确定点上细胞群的信息。**方法** 利用软刻法制作带后向台阶的PDMS流动腔和PDMS印章,再通过微接触压印在流动腔底部形成图型化的纤粘蛋白结构,细胞选择性生长在有蛋白的表面上。**结果** 获得了1个光学性能良好并能模拟体内特殊流形的流动腔及各种尺寸大小的印章,在腔底形成了纤粘蛋白图型和细胞小岛。**结论** 该加工方法快速、简便,制作的PDMS流动腔可进一步用于体外细胞力学行为的实时研究。

关键词: 流动腔;聚二甲基硅氧烷(PDMS);图型化;微接触压印(μCP);数字模拟
中图法分类号: R318.01; R322.121; R543.5 **文献标识码:** A

Micropatterning of endothelial cells on poly-dimethylsiloxane flow channel bottom

ZHANG Li[1,2], HAN Ya-gang[1,3], JIANG Jia-huan[1], CAI Shao-xi[1] ([1]Key Laboratory of Biomechanics & Tissue Engineering under State Ministry of Education, [3]College of Electrical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044; [2]Department of Analytic Chemistry, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To simulate the blood flow features of the susceptible sites of atherosclerosis *in vitro*. The cell micro-patterning is to be obtained on the bottom of channel for the information about single cell or cell groups. **Methods** Poly-dimethylsiloxane (PDMS) flow channel and PDMS stamp were fabricated by soft lithography. Fibronectin pattern was formed on chamber bottom by micro-contact printing method and cells selectively attached on fibronectin pattern. **Results** The PDMS-patterned chamber that possessed favorable optical property and the PDMS stamps with different sizes were obtained. Cells attached on fibronectin pattern presented square array. **Conclusion** The fabricated methods are quick and simple. The chamber could be used for the advanced real-time investigation of cell mechanical behavior *in vitro*.

Key words: flow channel; poly-dimethylsiloxane; patterning; micro-contact printing (μCP); computational simulation

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)病变好发于动脉血管的分叉与弯曲部位[1],令人们将其与该处所呈现的复杂的血液流动状态联系起来。作为血液与血管壁的界面,内皮细胞(endothelial cells, ECs)处于直接受到血流动力作用的特殊位置上。近年来的应力-生长关系的研究显示[2],细胞的功能和表型与所处的力学环境密切相关,平行平板流动腔是进行体外细胞力学行为研究的主要手段之一,它是一个高度远小于横向和纵向尺寸的扁平流动腔室。为了模拟体内AS好发部位血液流动所呈现的多种复杂流型,本研究在Chiu等[3]的实验基础上,探索采用新的高分子材料聚二甲基硅氧烷(poly-dimethylsiloxane, PDMS)构建一个带后向台阶的流动腔(back vertical-step flow channel, VSF),并对流场进行了数值模拟。同时为了获取细胞在流场的相同时间、地点受到相同机械刺激后产生的各种生物学响应,并对其进行对照、比较,对流动腔底做简单的图形加工,并利用材料本身的化学特性来寻求细胞微图型化的实现方式,从而获得单个细胞或腔内某准确位点处细胞群的特定响应。

1 材料与方法

1.1 材料

Sylgard 184型PDMS预聚体及固化剂购自Dow Corning Corp.(美国)。硅片,直径100 mm,厚(500±25)μm,电阻率4~7 Ω/cm,晶向P(100),购自四川峨眉山半导体公司。流动腔硅阳模由本实验室完成。图型化硅片的微加工由中国电子科技集团公司24所协作完成,尺寸大小为20 μm×20 μm~600 μm×600 μm。纤黏蛋白购自Sigma公司(美国)。泼福龙购自Fluorochem Corp.(英国),使用时与正己烷按1:100比例混合。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(10272122)
Supported by the National Natural Sciences Foundation of China (10272122)
作者简介: 张 莉(1971-),女,重庆市人,博士研究生,讲师,主要从事生物医学工程方面的研究。电话:(023)68752306
通讯作者: 蔡绍皙,电话:(023)65112097
收稿日期: 2006-10-21;**修回日期:** 2006-11-21

1.2 细胞系与细胞培养

人脐静脉内皮细胞系 ECV304，购自武汉中国典型培养物保藏中心。细胞贴壁生长于含 10% 新生牛血清（FCS）的 M199 培养基（Gibco）中，在 37 ℃，5% CO_2 培养箱中培养。

种植细胞前，先用 PDMS 微图型化印章将纤黏蛋白印在 PDMS 流动腔底部，孵育过夜以利于细胞黏附。培养于培养瓶的细胞经常规传代处理后，将细胞悬液加入流动腔中，浓度为 2×10^5/ml，封闭流动腔的出入口，置于培养箱中静态培养，细胞贴壁后，用新鲜培养基轻轻吹洗，去除未贴壁细胞，重新加入培养基，观察细胞微阵列的形成，并进行显微拍照。

1.3 PDMS 流动腔的加工

采用软刻法[4-6]制作流动腔。将硅片制作的流动腔阳模用丙酮超声清洗 5 min 后用无水乙醇冲洗，然后用无水乙醇超声清洗 5 min 并用去离子水冲洗，再用去离子水超声清洗 5 min，最后用氮气流吹干。在洁净的阳模表面附着上一层 perfluoro 以利于 PDMS 流动腔表面的光滑与剥离。将 PDMS 预聚体（胶与固化剂质量比为 10∶1）浇注在硅阳模上，置于容器内真空脱气，去除预聚体中的气泡，于 80 ℃ 固化 1 h 后剥离即成。制作流动腔盖片时，预先插入 2 根硅橡胶管（直径 5 mm），再倒入 PDMS 预聚体，待其固化后可作为流体的出入口。

1.4 PDMS 流动腔的微图型化

按照与 PDMS 流动腔相同的加工方法，在微图型化硅模上制作 PDMS 微图型化印章。再利用微接触压印（microcontact printing，μCP）的方法在流动腔底部印上图型，即将印章浸泡于 25 μg/ml 纤黏蛋白溶液中 1～2 h，用氮气吹干后轻扣在流动腔的底部，共形接触 1 min（图 1）。取下印章，用相差显微镜拍照。

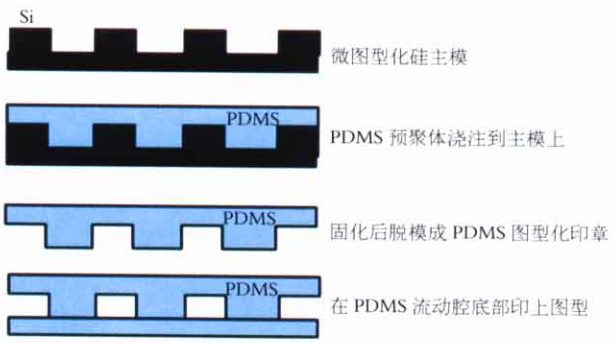


图 1 流动腔的微图型化步骤

1.5 PDMS 流动腔的数字模拟

人体主动脉中，血液对血管内壁的切应力 τ 约为 40 dynes/cm^2，根据公式 $\tau=6\mu Q/H^2W$（其中 μ 为液体黏度，Q 为入口处流量，H 为通道的高，W 为通道的宽），根据构建的通道尺寸及流体性质，选择入口流速 $u=2$ cm/s，模拟人体内相同剪切力作用下的流场情况（所用建模软件为 Gambit 2.0，分析软件为 FLUENT 5.5）。

利用流体力学原理，采用有限元分析方法分析通道内的流型和剪切力分布。假设流体为具有恒定密度、不可压缩的牛顿流体，边界材料为刚性、不可渗透的，压力、速率等所有变量的初始条件均设为 0，任一壁面上的边界条件均是非滑动条件（无速度）。稳态流的泊松速度方程被用于特殊流速作为入口边界条件。对于出口边界条件，采用了完全流的条件，速率梯度设为 0。

边界泊松控制方程为：

$$cu(\xi)=\int_{\Omega}pu^*\,d\Omega+\int_s u\frac{\partial u^*}{\partial n}ds-\int_s qu^*\,ds$$

其中：p 为压力，u 为速度，$u=-\frac{\partial\Psi}{\partial y}$，$q$ 为流量，Ω 为积分体，s 为积分面。

N-S 函数方程为：

$$\begin{cases}\Psi_{xx}+\Psi_{yy}=-\omega\\ \omega_t+\Psi_y\omega_x-\Psi_x\omega_y=u(\omega_{xx}+\omega_{yy})\end{cases}$$

其中：Ψ 表示流函数，ω 表示涡量，$u=-\frac{\partial\Psi}{\partial x}$，

$\omega=-\frac{\partial v}{\partial x}-\frac{\partial u}{\partial y}$。

2 结果

2.1 流动腔

制作的带后向台阶的流动腔如图 2 所示，通道宽 8 mm，进口处高 0.5 mm，主通道高 1 mm，台阶上下的通道长分别为 15、45 mm。其中充满墨水以便于观察。

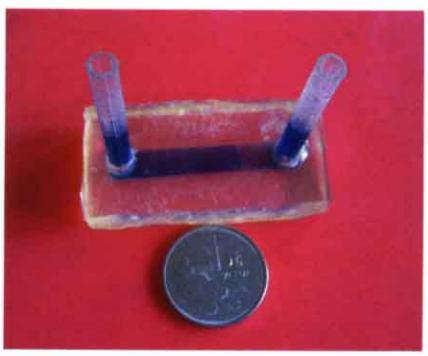


图 2 带后向台阶的流动腔

由 24 所协作完成的不同尺寸的图型化硅模，按 1.4 的方法制作 PDMS 印章（图 3），发现 PDMS 印章完好的保存了硅模上的图形。在纤黏蛋白的转印过程中，蛋白与基底发生物理吸附，溶液中的水分挥发后即在底面形成蛋白结晶体阵列图案。在此流动腔中种植 ECV304 细胞，摄取图型化细胞的显微图片（图 4）。

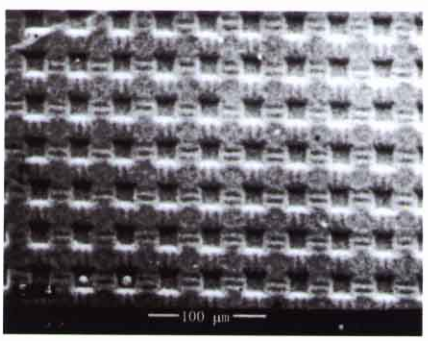


图 3 PDMS 印章的电镜图 （×200）

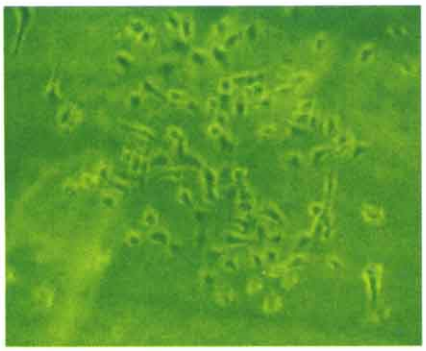


图 4　ECV304 细胞培养 24 h 图型化显微图片　（×100）

2.2　数字模拟

数字模拟结果显示，在 VSF 中能形成流动停滞、涡流与再附流动等，该特征与体内动脉弯曲和分叉管处的血液流动相似，形成了一个扰动流场（图 5）。

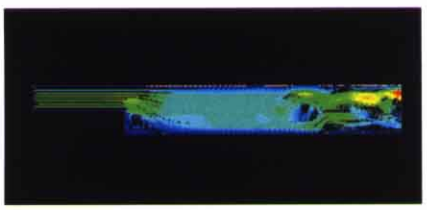


图 5　流动腔的速率线

以上各图显示了 VSF 边界上模拟的剪切力分布。需注意在流动腔中，剪切力会随着流动方向而变。大的剪切力梯度存在于扰动流区域，尤其是在台阶附近和再附区域两个部分。在台阶处，剪切力几乎为零，在流动通道台阶之后，剪切力呈稳步提升的状态，但是出现了 3 个极大峰。图 6 中，局部最大存在于 X = 2.5 cm 和 X = 3.5 cm 处，整体最大处于 X = 5.0 cm 处，后者可能是由于惯性的作用。流动腔中再循环涡流中心处的剪切力相对较高，这显然是由于再循环涡流处的高流速梯度所致。在完全流动区域的剪切力分布几乎保持恒定。可知，只要通道足够长，剪切力最后会趋于稳定并稳定在一个数值上。与以往的仿真研究相比，由于采用了 2 cm/s 的入口流速，在流场分布和切应力分布上出现了一定差异，首先在流场中形成了 3 个大小，方向均不一样的涡流，其次，在切应力分布上，也相应出现了 3 个峰值，与以往的单漩涡，单峰值有显著差异。

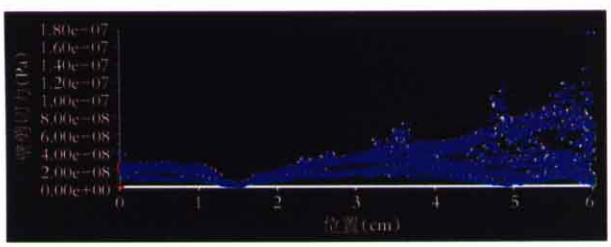


图 6　三维壁剪切力分布图

3　讨论

众多的体外研究显示，动脉粥样硬化与疾病好发部位的特殊血流动力存在密切相关，也获取了一系列细胞内各种蛋白、基因与流动力间关系的信息，那么如何确认、整合这些信息与数据，并在逻辑上归拢串成一条能解释 AS“好发”现象的归因，是一个令许多研究者感兴趣的问题。如何才能对细胞受到刺激后产生的各种不同生物信号进行同时的实时观测，以便于在同样的实验背景下进行整合比较？这是一个重要的但几乎不可能达成的目的。因此我们试图采用一个可替代的等效方法，即获取重复实验中细胞在流场的相同时间、地点受到相同机械刺激后产生的各种生物学响应，然后对其加以对照、比较。研究的目的是尝试构建一个可用于实时观测的实验设备原型，试图追踪细胞的力学行为，使摄取的响应信号能用于平行的比较、整合。

本研究利用微接触压印（μCP）的方法将流动腔底部微图型化以达到获得可重复性地点的目的。设计图型尺寸为 20 μm × 20 μm ~ 600 μm × 600 μm，由此可按不同的实验要求，种植不同种类和数量的细胞。同时流动腔中的细胞微阵列还可用于力学条件下细胞铺展形态、胞间接触程度与细胞功能关系等众多研究中。

流动腔是体外进行细胞力学行为研究的重要手段之一，本研究所采用的 VSF 能模拟动脉粥样硬化好发部位血液流动所呈现的多种复杂流型，如流动分离与再附，所形成的流动停滞和涡流与体内流动分离状况类似。玻璃、硅片等材料现已广泛用于流动腔的加工，但制作此类流动腔耗时较长，键合麻烦，材料易碎，因此，高分子聚合物已逐渐成为制作生物微流控装置的重要材料。PDMS 能透过 300 nm 以上的紫外-可见光；无毒，具有化学惰性和较好的生物相容性；能用软刻法快速、简便的加工微通道；有自黏附性，是最具吸引力的微流体装置加工材料之一。本研究将流动腔的制作材料从脆而硬变为软而具有生物相容性，除了可以促进加工工艺的进步外，还可使实验结果更接近于体内的真实情况。同时，由于 PDMS 良好的光学特性，将其与绿色荧光蛋白联用还可用于实时的观察。PDMS 是一种特殊的有机硅材料，表面自由能非常低，未经处理的表面具有疏水性，在短时间内不利于细胞的贴壁生长，而且具有良好的生物相容性，对细胞无毒害作用。因此，本研究选用了 PDMS 来制作 VSF，并在通道底面图型化上一层纤黏蛋白薄层，细胞选择性贴壁生长在蛋白吸附区域，从而达到细胞图型化的效果。

PDMS 可高保真的复制主模上微米级的图形；其化学惰性使得图型化过程中涉及的生化制品不会损坏 PDMS 表面，因此，本研究同时采用 PDMS 来制作印章。PDMS 印章主模用硅片加工，形成具有一定微图形的表面拓扑结构，优点是硅片易于保存清洗，硅材料

的强度和硬度较好，表面结构不易变形，可长期使用。但存在加工工艺复杂的问题，且硅材料的刻蚀深度有限，难于进行深度大于100 μm的刻蚀。

本研究构建了一个可用于实时观测的能模拟体内动脉粥样硬化好发部位复杂血液流动状态的流动腔，计算机仿真了流场，并对流动状态下细胞的空间定位进行了初步的尝试，这些工作都将有利于进一步体外细胞力学行为的研究。

参考文献：

[1] ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s[J]. Nature, 1993, 362(6423): 801-809.

[2] TOPPRE J N, GIMBRONE M A Jr.. Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype [J]. Mol Med Today, 1999, 5(1): 40-46.

[3] CHIU J J, WANG D L, CHIEN S, *et al*. Effects of disturbed flow on endothelial cells[J]. J Biomech Eng, 1998, 120(1): 2-8.

[4] FUJII T. PDMS-based microfluidic devices for biomedical applications [J]. Microelectronic Engineering, 2002, 61-62: 907-914.

[5] EFIMENKO K, WALLANCE W E, GENZER J. Surface modification of Sylgard-184 poly(dimethyl siloxane) networks by ultraviolet and ultraviolet/ozone treatment[J]. J Colloid Interface Sci, 2002, 254(2): 306-315.

[6] CHOI W M, PARK O O. A soft-imprint technique for direct fabrication of submicron scale patterns using a surface-modified PDMS mold[J]. Microelectronic Engineering, 2003, 70 (1): 131-136.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2006)19-1930-01

支撑喉镜下成功摘除声带巨大息肉1例

王自力 （重庆市大足县人民医院耳鼻咽喉科，大足 402360）

患者，男，39岁，农民，因"声嘶4年，逐渐加重1年，伴呼吸异常感觉2 d"于2004年9月15日就诊，患者诉明显感觉呼吸时有一异物在喉部随呼吸上下活动，不能咳出，无痰，偶尔觉影响呼吸。门诊作间接喉镜和纤维鼻咽喉镜检查见声门处巨大息肉样新生物，遮盖声门大部，可随呼吸上下活动，不能窥清根部在左或右，但疑为左侧声带带蒂息肉，以"声带巨大新生物"入院。体检：T 36.5 ℃，P 80次/min，R 20次/min，BP 112/63 mmHg。呼吸平稳，活动后无呼吸困难。无紫绀，无心累，心慌。术前检查三大常规、血凝分析、心电图、胸透正常。

专科检查：声门处可见巨大息肉新生物，表面光滑，充血水肿，遮盖声门超过3/4，直径约1.5 cm，声带前联合和前中部分全部被遮盖，不能窥清根部附着部位，据肿物上下活动情况看，根蒂部似在左侧声带边缘。

治疗经过：入院后作好术前检查和准备，并于术前应用抗生素，使用激素地塞米松20 mg/d。为预防出血，术前应用止血药。在局麻下行支撑喉镜下声带息肉摘除术。局麻下顺利插入喉镜，支撑固定。暴露声门部并清楚可见巨大息肉。但息肉太大阻塞声门，牵拉拟暴露根蒂面切除时无法保持呼吸通畅，患者呼吸困难。先后两次努力尝试后不能成功。放弃局麻行气管切开，经气管切口插管并全麻，然后支撑喉镜下暴露息肉肿物，息肉太大，全麻时声带固定，见声门几乎完全被肿物阻塞，直径1.5~2 cm。以息肉钳牵拉见根蒂部在右侧声带靠前联合处，以喉剪在根蒂部剪切，基底较宽大，息肉充血水肿，切口易出血。剪切后第1次切除大部，取出一直径约1.2 cm的息肉样物，然后可清楚窥见残留的小部分，切口易出血，声门已阻塞，再以息肉钳和喉剪配合全部将息肉摘除干净，见声带边缘已整齐，声门已阻塞，吸净血性分泌物后观察无出血，结束手术。历时约3 h。术后诊断：右侧声带息肉。术后抗感染、止血、激素消水肿，雾化吸入，住院观察10 d，气管堵管，拔管，伤口愈合，拆线。声嘶明显好转，说话声音较清晰，呼吸正常。随访至今情况良好，声音清晰，双侧声带边缘光滑，闭合好，呼吸正常，息肉无复发。

讨论

声带息肉为耳鼻喉科常见疾病，而支撑喉镜下声带息肉摘除也是耳鼻喉科用于治疗声带息肉的常见手术方式，绝大多数病例都能在局麻下完成[1]。本例患者息肉巨大，直径约2 cm，在临床上如此巨大的声带息肉实属少见。在局麻下尝试未能成功后改为气管切开插管全麻后行支撑喉镜下息肉摘除，手术最终得以顺利完成。息肉摘除完整，干净，声带无缺损，病检结果证实为息肉。术后随访1年零9个月无复发，得以治愈。

经验教训：声带息肉虽为常见疾病，但如此巨大的息肉确实少见，连根蒂附着部位都不能有效明确，术前门诊行间接喉镜和纤维喉镜均不能窥清，而据肿物活动情况推测根蒂在左侧，而手术证实为右侧声带息肉。息肉巨大已遮盖声门超过3/4，术前虽已考虑到喉阻塞可能，但仍估计不足，以至局麻下未成功又立即改全麻，给患者增加了一次痛苦，且也增加了一次手术的风险，因此应尽量考虑周到，估计充分，以避免不必要的风险。

关键词：声带息肉；支撑喉镜

中图法分类号：R767.4 文献标识码：B

参考文献：

[1] 杨 帆，刘 霞. 全麻支撑喉镜下声带息肉手术204例疗效观察[J]. 中国误诊学杂志，2005，5(17)：6823-6824.

（编辑 汪勤俭）

作者简介：王自力(1965-)，男，重庆市大足县人，主治医师，主要从事耳鼻咽喉科临床梗治方面的研究。电话：(023)43901930

收稿日期：2006-06-19；修回日期：2006-09-05