

以软刻技术微图案化培养纹状体神经元的形态学研究*

高 侃 刘丙方 徐群渊**

(首都医科大学北京神经科学研究所, 北京市神经再生修复研究重点实验室, 教育部神经变性病重点实验室, 北京 100069)

摘要 探讨以软刻技术微加工带正电荷的聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)图案, 对培养纹状体神经元黏附存活及突起生长的影响。以软刻技术(微接触印刷方法)微加工三种不同的黏附底物: 层粘连蛋白(laminin, LN)、带正电荷的多聚赖氨酸(poly-L-lysine, PLL)和 PEI。新生乳鼠纹状体神经元体外分离培养, 观察不同黏附底物对纹状体神经元黏附、存活和突起生长状态的影响, 观察神经元在不同黏附底物上形成网络图案的差异。结果表明, 在 PEI 和 PLL 表面生长的神经元数量明显大于 LN 组, PEI 与 PLL、LN 相比能形成更为完整的神经元图案。带强正电荷的 PEI 有助于神经元在其表面形成相对完整的图案, 是构建体外神经网络的一种良好界面材料。

关键词 聚乙烯亚胺, 软刻技术, 纹状体神经元, 细胞培养
学科分类号 R392.12, R319

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00652

体外构建简化的神经网络模型在研究细胞生物传感器、神经电信号、药物筛选以及神经科学基本原理等诸多方面有巨大潜在意义^[1,2]。在体外按照设计的图案构建神经网络模型是当前本领域中需要突破的重大关键问题。通过软刻技术在某种基底材料背景上印刷特定能促使细胞黏附并生长的物质(如细胞外基质蛋白或一些大分子聚合物), 则可能达到体外图案化培养神经细胞并使之形成网络的目的^[3]。软刻技术的原理是先用中间介质(如聚二甲基硅氧烷 PDMS)制成带有凹凸图形的弹性软印章, 再把它经过光刻生成的微图案转移至基底材料上^[4]。所需的图案可以通过微米或纳米水平的微加工在材料表面制成。利用软刻技术构建的几何图形加上印刷物质的化学特性, 就可以人为地在空间上定向诱导神经突起的生长, 创建出所需的神经元网络模型。

常选择用于印刷的生物大分子有细胞外基质蛋白和带正电荷的多肽聚合物。细胞外基质蛋白, 例如层粘连蛋白(laminin, LN), 主要通过和细胞内整合素(integrin)的结合来实现细胞的黏附。这种受体-配体结合的方式与血清蛋白的某些成分有关^[5], 故在无血清培养条件下, 细胞便常常不能很好地黏附在基质蛋白表面而集聚成团, 这与为构建神经网络、提高神经元纯度所需采用的无血清培养相悖。

相反, 依靠静电吸附作用来促进细胞黏附可以很好地解决无血清条件下细胞的黏附问题。所以, 选择表面带正电荷的多肽聚合物如多聚赖氨酸(PLL)来构建体外神经网络相对比较理想。但是, PLL 的多肽骨架在溶液中容易水解而导致培养神经元从基底材料表面脱落。为了解决这个研究瓶颈, 本实验拟选择另一种带正电荷的物质聚乙烯亚胺(PEI), 试探其是否能改善图案化培养神经细胞的作用。以往一些实验已经证明, PEI 作为生物材料促进某些细胞黏附的能力比 PLL 更有效^[6~9]; 最近 Herlem 等^[10]发现, PEI 经过电化学氧化方法在铂金或硅表面可形成一层超薄晶体膜, 这种膜具有绝缘和 pH 值敏感特性^[11~15], 因此, 选用 PEI 作为微接触印刷的材料更有利于将来在微电子器件上输入或输出信号, 实现神经元与电子器件的通讯联系, 在生物传感器研究中有极好的应用前景。但神经元在这种生物材料形成的图案上生长状态还缺少研究。为此, 我们

* 国家自然科学基金资助项目(30700210)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-83911464, E-mail: xuqy@ccmu.edu.cn

收稿日期: 2008-09-20, 接受日期: 2008-10-30

比较了纹状体神经元在 PEI、PLL 和 LN 3 种不同黏附底物上的黏附、存活及突起生长情况。我们的结果表明,在相同培养密度下,纹状体神经元在 PEI 界面材料上黏附性较好,能够形成更为完整的神经元网络图案。采用微接触印刷技术这项崭新的工艺结合传统的细胞培养技术,将来有望在体外人工构建神经网络的模型,深入研究中枢神经系统各种疾病的发生机制。

1 材料与方法

1.1 材料

动物: 新生 24 h 内的 SD 大鼠(购自首都医科大学实验动物中心)。

主要试剂: 培养基 (Neurobasal-A, Gibco, Cat.No.10888), B27 添加剂(Gibco, Cat.No.17504-044), L-谷氨酰胺(0.5 mmol/L), β -FGF (Gibco, Cat.No.13256, 10 μ g/L)。软刻中作为印章使用聚二甲基硅氧烷 (PDMS, Sylgard 184, DownCorning, Midland, MI)。软刻中作为印刷“墨水”使用的大分子蛋白包括层粘连蛋白 laminin(LN: L2020-1MG, Sigma; 使用浓度为 20 mg/L)、多聚赖氨酸(PLL, P4832, Sigma; 分子质量 150~300 ku; 使用浓度为 0.05 mmol/L)和聚乙烯亚胺(PEI, P3143, Sigma; 分子质量 750 ku; 使用浓度为 0.01%)。主要抗体为 Anti-MAP₂ 抗体 (Sigma, M1406)、Anti-GABA (γ -aminobutyric acid) 抗体 (Sigma, N2052)。

1.2 图案设计、主模版及 PDMS 印章的制备

主模版采用光刻方法制备,使用硅作为基片。

首先使用 L-Edit 设计绘制图案(图 1a),将设计好的图案委托中国科学院微电子研究所加工,制备得到掩模铬板后执行光刻,曝光后得到含光刻胶图案的主模版(图 1b)。选用负性光刻胶作为微接触印刷模版的光刻胶,光刻胶图案的浮凸深度依赖于光刻胶的涂覆厚度(本试验光刻胶的涂覆厚度为 1~2 μ m)。按照说明书^[16]配置 PDMS 预聚体,浇注于主模版上,放入烘箱 90℃ 下高温固化 2 h,保存在去离子水中。

1.3 玻璃基片的表面修饰及印刷

印刷基片选用直径 0.8 cm、厚度 0.17 mm 的玻璃片。玻璃片用新鲜配置的热 Piranha 溶液即浓硫酸/双氧水溶液($H_2SO_4:H_2O_2=3:1$)处理以暴露表面带负电荷的羟基集团,之后用去离子水清洗 3 次,每次 5 min。为了比较 3 种不同大分子对神经元黏附的影响,本试验首先在处理过的玻片表面直接涂敷 PEI、PLL 和 LN,采用 Leica 图像分析系统对黏附在 3 种不同分子表面的神经元的数量、突起长度进行分析,然后用微接触印刷技术将 3 种分子印刷在处理过的玻璃基片表面。印刷过程如下: PDMS 印章浸入 75%乙醇中消毒 20 min,超净台内干燥后在图案表面涂敷 PEI、PLL 和 LN 溶液,充分接触 25 min 之后用低流速的氮气不完全吹干印章表面,立即贴敷于处理过的玻璃基片上,施以一定的压力印制 25 min。轻轻揭开印章,即形成图案(图 1c)。光镜下检查玻璃基片图案印刷质量并放置于 24 孔板孔内,种植细胞前用 PBS 清洗 2 遍。

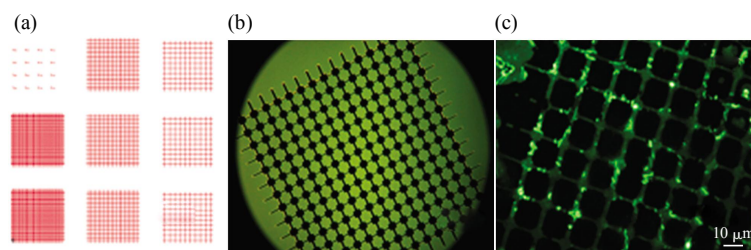


Fig. 1 Patterns design, template and PDMS stamp fabrication

(a) Patterns of microcontact printing template designed by L-Edit (lines width: 10 μ m, space between lines: 50 μ m, 100 μ m, 200 μ m, nodes diameter: 10 μ m, 30 μ m, 50 μ m). (b) Patterns' microscopic photographs of templates (space between lines: 100 μ m, nodes diameter: 50 μ m). (c) Immunofluorescent image of second antibody Goat-antirabbit488 micropatterns.

1.4 细胞培养、免疫荧光化学染色及形态学观察和测量

纹状体神经元取材于新生 24 h 内的 SD 大鼠,冰冻麻醉 20 min 后,断头处死,低温下无菌操作取出脑部并剔除脑膜和血管,在解剖显微镜下分离

出纹状体。37℃ 下 0.125% 胰酶消化约 10 min 后加入含血清的培养基终止消化。离心(1 000 r/min)2~3 min,吸弃上清后加入培养基 Neurobasal-A 轻轻吹打 60 次,用 300 目(53 μ m)过筛后再次离心(1 000 r/min)4 min。弃上清液,重悬于 Neurobasal-A

培养基中. 用血球计数板计数并按不同细胞密度稀释后接种, 4~6 h 后半量换液, 之后每 3~4 天半量换液. 培养 7 天后取出玻璃基片, 4%多聚甲醛固定细胞, 用 anti-GABA 和 anti-MAP₂ 抗体免疫荧光双标染色.

利用 Leica Qwin 显微镜和图像处理分析系统观察神经细胞在 3 种不同分子表面的黏附、存活及突起生长状态. 在 20 倍物镜下随机选取 10 个视野, 计数视野中 GABA 阳性神经元的数量, 并测量其突起的长度. 将每组视野内 GABA 阳性神经元的突起长度之和, 除以每组神经元数, 将所得数据采用 SPSS11.5 软件进行单因素方差分析.

2 结 果

2.1 不同黏附底物对纹状体神经元黏附、存活和突起生长情况的影响

培养 24 h 后, 在 PEI 表面上神经元均匀分布

于玻片表面, 数量多; 在 PLL 表面生长的神经元状态与在 PEI 表面的神经元状态类似, 但密度较低. 在 LN 组, 大部分细胞未贴壁, 而贴壁的神经元常聚集成团. 但在 LN 表面上黏附的神经元与其他两组相比突起伸出最早, 且长度较长. 培养 7 天后, 经过几次换液, 在 PEI 组的神经细胞(图 2b)仍呈均匀分布, 细胞数量未见明显减少, 而生长在 LN 表面上的神经细胞常可见到成团脱落, 细胞数量进一步减少. 通过免疫荧光化学染色的方法进一步鉴定得知大部分神经元是 GABA 阳性神经元, 这些神经细胞胞体较圆, 伸出的突起较长, 或呈分支状, 多为多极和双极突起, 很少见到单极突起. (图 2a~2c). 培养 7 天后, 对生长在不同材料表面的 GABA 阳性神经元的数量和突起长度定量分析. 结果显示, 在 PEI 和 PLL 表面生长的神经元的数量明显大于 LN 组, 但神经元突起的平均长度却低于在 LN 组生长的神经元(表 1).

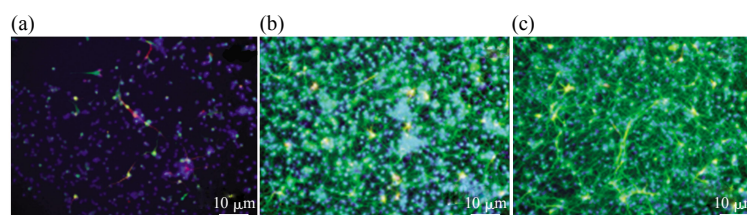


Fig. 2 Immunofluorescent image of anti-GABA+anti-MAP₂ labelled striatal neurons cultured for 7 days

(a) Using LN as substrate, the nuclei of neurons were stained with Hoechst $\times 200$. (b) Using PEI as substrate, the nuclei of neurons were stained with Hoechst $\times 200$. (c) Using PLL as substrate, the nuclei of neurons were stained with Hoechst $\times 200$.

Table 1 The cell number and average length of neurites of striatal neurons grown on different substrates after 7 cultural days

Group	Striatal neurons	
	Cell number/visual field	Average/ength of neuritis/ μm
PEI	$75.60 \pm 1.360^{1)}$	$26.9740 \pm 0.4942^{1)}$
PLL	$68.90 \pm 1.149^{2)}$	$37.0890 \pm 1.3759^{2)}$
LN	$32.00 \pm 2.071^{3)}$	$57.1060 \pm 2.4628^{3)}$

¹⁾ vs PLL and PEI group, $P < 0.01$; ²⁾ vs LN group, $P < 0.01$, vs PEI group, $P < 0.05$; ³⁾ vs LN group, $P < 0.01$, vs PLL group, $P < 0.05$. $\bar{x} \pm s$.

2.2 体外微图案化培养的神经元形态学观察

采用软刻技术在玻璃表面印刷 3 种不同的界面材料, PEI、PLL 和 LN. 神经元接种 24 h 以后, 在 PEI 组和 PLL 组可观察到神经元已经循玻璃基片图案形成图案. 神经细胞的胞体多位于网格交点

处, 但也有细胞黏附在网格线上. 细胞已经伸出细小的突起, 突起沿图案网格生长(图 3b). PLL 组神经细胞也黏附在网格线上, 神经细胞的突起沿着网格延伸, 常见到神经细胞在网格交点处聚集成团(图 3c). 在 LN 组, 神经细胞多呈积聚状态分布, 未形成明显的图案. 培养 3~4 天时, 经过换液时的轻微吹打及振荡, 神经元形态在 PEI 和 PLL 组比培养 24 h 时更为清晰, 随培养时间延长, 神经突起延伸更长, 神经网络变得更为完整. 培养第 7 天, 在 PEI 组可以发现神经细胞胞体变大, 突起更为密集, 形成了密集的神经元网格图案; PLL 组也能形成完整的图案, 但随着培养时间的延长其细胞在图案上黏附力有所下降, 可能因随换液次数增加有部分细胞成片脱落; 在 LN 组, 所黏附的细胞数最少, 且细胞与 PEI 组和 PLL 组相比更易聚集成团, 几乎不能形成图案(图 3a~c).

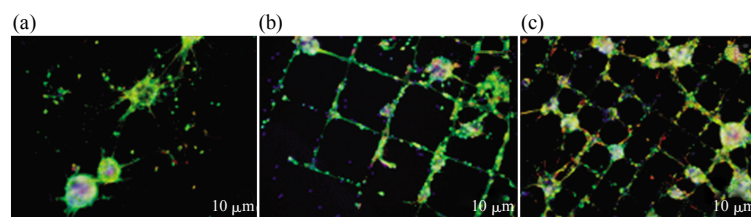


Fig. 3 Immunofluorescent image of anti-GABA+anti-MAP₂ labelled striatal neurons cultured for 7 days on LN, PEI and PLL micro-patterned grids on negatively charged glass coverslips

(a) The nuclei of neurons were stained with Hoechst $\times 200$. (b) The space between the grid lines was 200 μm . The nuclei of neurons were stained with Hoechst $\times 200$. (c) The space between the grid lines was 100 μm . The nuclei of neurons were stained with Hoechst $\times 200$.

3 讨 论

本研究采用的软刻技术是一种在基片表面进行微细加工的新技术. 它通过把光刻设备生成的图案重复转印到 PDMS 弹性软印章上, 在培养基片上印刷 30 nm 到 100 μm 范围的加工图案. 这一方法可以对体外培养细胞的生长、分化进行空间围度的调控, 可以在微米甚至纳米刻度级基片上研究神经细胞的形貌信息和以及空间结构对细胞生长的影响^[17, 18]. 结合微电子器件还可以构建闭合的神经元环路, 从而模拟体内复杂的神经网络^[16, 18]并实现与体外特定环境的通讯联系.

本研究在材料上培养的细胞是纹状体神经元, 纹状体是基底神经节中主要结构, 接受来自大脑皮质和某些皮质下结构的传入纤维. 纹状体神经元主要由中等大小及树突有大量棘刺的神经元组成, 这种神经元的特点是大量接受传入的信息, 几乎所有皮质都向纹状体发出纤维并且这些纤维有很好的躯体定位排列关系, 它们形成漏斗一样的结构, 经过整合后投射到丘脑和脑干等部位, 参与神经系统多种生理功能的调节. 所以, 与纹状体有关的病变会使患者随意运动困难, 如亨廷顿病及帕金森病等. 本试验试图用纹状体神经元建立图案化神经网络, 使其能够在材料上实现定位排列. 进一步研究将会使其与皮质神经元或黑质神经元共培养, 期望在体外建立特定的神经网络来模拟体内复杂的神经环路, 对于研究与纹状体有关的疾病, 甚至可以和微电子设备连接形成人工环路替代脑内固有的神经环路等都有重要的探索性意义.

然而, 在体外微图案化培养神经细胞、建立能和微电子设备相匹配并具有功能的神经网络必须先解决神经细胞黏附和存活问题. 为此, 本试验选择了 3 种界面材料. 从比较神经细胞在 3 种未印刷图

案条件下材料上黏附、生长状况看, 带正电荷的 PEI 在无血清培养条件下对细胞的黏附作用明显优于 LN. 这主要可能因为 PEI 是一种带正电荷的多聚体, 分子链上拥有大量的氨基基团, 而细胞表面则带有负电荷. 这种静电吸附作用可加速细胞沉降在材料表面, 一旦贴附下来, 神经元自身还会分泌一些细胞外基质蛋白, 使其锚定得更加牢固^[19, 20].

而 LN 主要是通过 *integrin* 受体的结合, 引发细胞内的骨架蛋白和胞内信号转导通路, 从而促进细胞的黏附和成活. 此过程中, 血清中的某些因子在一些环节上可能参与调节. 所以, 如用无血清培养基培养神经元, 就会削弱 LN 通过血清促进细胞黏附的作用, 造成 LN 组的细胞黏附最少. 在原代培养早期, 培养的神经元中往往会混有一些血管内皮细胞和胶质细胞, 神经元则会依靠这些细胞分泌的营养成分甚至直接黏附在这些细胞表面而良好存活. 但随着培养时间的延长, 血管内皮细胞和胶质细胞会因失去血清支持而死亡, 依赖这些细胞的神经元数量也就随之减少. 这都是本试验观察到 LN 表面上附着的神经细胞数量最少并随培养时间增加进一步递减的原因. 但是, 生长在 LN 表面的神经元与 PEI 和 PLL 组相比神经突起生长更快、长度更长. 这是因为 LN 本身可以和细胞内的骨架蛋白 *integrin* 结合而促进神经元轴突的生长^[9], 另外, 由于在 LN 组黏附神经细胞数量少、密度低, 降低了细胞间的接触抑制, 使神经细胞能得到较充分的营养与活动空间. 然而, 体内正常生长的神经元毕竟是呈密集排列方式存在的, 所以相比之下, 似乎在 PEI 和 PLL 表面上生长的神经元更接近神经元的正常生理状态. 从我们把 3 种黏附底物作为“墨水”印刷到基底材料的实验结果看, 神经细胞按照图案黏附生长的能力也与上述情况相一致. 随着不断换液, LN 组构建图案的稳定性最差, PLL 组

由于 PLL 不断水解, 图案的完整性也会受到影响. 这更加说明 PEI 大分子图案带正电荷的吸附作用比 LN 等蛋白质通过细胞膜表面受体进行吸附作用要强.

此外, 我们设想将 PEI 作为细胞表面材料应能更好地实现细胞与界面材料的信息传递. Herlem 等^[10]曾报道 PEI 经过电化学氧化后可以在铂金或硅表面形成一层超薄晶体膜, 这种膜有良好的绝缘性和 pH 值敏感性. 因此, 选用 PEI 作为微接触印刷的材料, 不仅能够使细胞形成更为稳定的图案, 而且更有利于将来在微电子器件上输入或输出信号, 实现神经元与电子器件的通讯联系.

我们利用微接触印刷技术微加工了 PEI、PLL 和 LN 三种不同的黏附底物, 观察到纹状体神经元在无血清培养的环境下, PEI 组形成更为完整清晰的图案, 而 LN 在无血清培养的环境下, 容易使细胞聚集成团, 不利于细胞的生长, 结果与我们的前期工作一致^[21], 说明正电荷的吸附作用要强于受体和配体结合的方式.

参 考 文 献

- Li N, Tourovskaia A, Folch A, *et al.* Biology on a chip: microfabrication for studying the behavior of cultured cells. *Crit Rev Biomed Eng*, 2003, **31**(5~6): 423~488
- Rhee S W, Taylor A M, Tu C H, *et al.* Patterned cell culture inside microfluidic devices. *Lab Chip*, 2005, **5**(1): 102~107
- Liu B F, Ma J, Gao E, *et al.* Development of an artificial neuronal network with post-mitotic rat fetal hippocampal cells by polyethylenimine. *Biosens Bioelectron*, 2008, **23**(8): 1221~1228
- Kumar A, Whitesides G M. Patterned condensation figures as optical diffraction gratings. *Science*, 1994, **263**(5163): 60~62
- Renaudin A, Lehmann M, Girault J, *et al.* Organization of point contacts in neuronal growth cones. *J Neurosci Res*, 1999, **55**(4): 458~471
- Ruoslahti E, Reed J C. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell*, 1994, **77**(44): 477~478
- Blau A, Weinl C, Mack J, *et al.* Promotion of neural cell adhesion by electrochemically generated and functionalized polymer films. *J Neurosci Methods*, 2001, **112**(9): 65~73
- Bledi Y, Domb A J, Linial M. Culturing neuronal cells on surfaces coated by a novel polyethyleneimine-based polymer. *Brain Res Protoc*, 2000, **5**(3): 282~289
- Boura C, Menu P, Payan E, *et al.* Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification. *Biomaterials*, 2003, **24**(20): 3521~3530
- Herlem G, Lakard B. Ab initio study of the electronic and structural properties of the crystalline polyethyleneimine polymer. *J Chem Phys*, 2004, **120**(19): 9376~9382
- Lakard B, Herlem G, Lakard S, *et al.* Urea potentiometric biosensor based on modified electrodes with urease immobilized on polyethylenimine films. *Biosens Bioelectron*, 2004, **19**(12): 1641~1647
- Lakard B, Herlem G, de Labachellerie M, *et al.* Miniaturized pH biosensors based on electrochemically modified electrodes with biocompatible polymers. *Biosens Bioelectron*, 2004, **19**(6): 595~606
- Lakard S, Herlem G, Propper A, *et al.* Adhesion and proliferation of cells on new polymers modified biomaterials. *Bioelectrochemistry*, 2004, **62**(1): 19~27
- Lakard S, Herlem G, Valles-Villareal N, *et al.* Culture of neural cells on polymers coated surfaces for biosensor applications. *Biosens Bioelectron*, 2005, **20**(10): 1946~1954
- Picaud S, Hoang P N, Herlem G. A molecular dynamics simulation of the electrical conductivity behaviors of highly concentrated liquid ammoniates NalalphaNH (3): comparison with experimental measurements. *J Chem Phys*, 2005, **122**(17): 171102
- Xia Y N, Whitesides G M. Soft lithography. *Annual Review of Materials Science*, 1998, **28**: 153~184
- Park T H, Shuler M L. Integration of cell culture and microfabrication technology. *Biotechnology Progress*, 2003, **19**(2): 243~253
- Shin H. Fabrication methods of an engineered microenvironment for analysis of cell-biomaterial interactions. *Biomaterials*, 2007, **28**(2): 126~133
- Ma J, Liu B F, Xu Q Y, *et al.* AFM study of hippocampal cells cultured on silicon wafers with nano-scale surface topograph. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2005, **44**(2~3): 152~157
- Tsuruma A, Tanaka M, Fukushima N, *et al.* Morphological changes of neurons on self-organized honeycomb patterned films. *Kobunshi Ronbunshu*, 2004, **61**(12): 628~633
- Liu B F, Ma J, Xu Q Y, *et al.* Regulation of charged groups and laminin patterns for selective neuronal adhesion. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2006, **53**(2): 175~178

A Morphologic Study on Creation of Neural Network of Cultured Striatal Neurons *in vitro* Using Soft Lithography Techniques*

GAO Kan, LIU Bing-Fang, XU Qun-Yuan**

(Beijing Institute for Neuroscience, Beijing Center of Neural Regeneration and Repairing, Key Laboratory for Neurodegenerative Diseases of The Ministry of Education, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract To investigate the attachment and neurite growth of patterned striatal neurons on the surface of polyethyleneimine (PEI) *in vitro*, by a soft lithography technique. Three different substrates, including Laminin (LN), poly-L-lysine (PLL) and PEI characterized with strong positive surface charges were micro-patterned using soft lithography techniques. Striatal neurons from postnatal rats were cultured *in vitro*. The condition of cell adhesion, living and the neurite growth of the cultured neurons on different substrates were observed, and the differences of neural network patterns fabricated on the three substrates were evaluated. The quantity of neuronal growth on the surface of PEI and PLL is apparently larger than that on LN. Moreover, the coated pattern of neurons on the PEI is more integrated than that on the PLL and LN. The PEI characterized with strong positive surface charges is capable of well fabricating more continuous and integrated neural patterns, which is an ideal interfacial surface to realize the artificial neural network *in vitro*.

Key words polyethyleneimine, soft lithography, striatal neurons, cell culture

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00652

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30700210).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-83911464, E-mail: xuqy@ccmu.edu.cn

Received: September 20, 2008 Accepted: October 30, 2008