

用于细胞球状体培养的准球形底微孔阵列的快速加工方法

张郭远^{1,2} 吴蕾^{*1,2} 彭熙尧^{1,2} 葛玉卿^{1,2} 刘婷¹ 徐铁刚^{*1}
赵建龙^{*1,2}

¹(中国科学院上海微系统与信息技术研究所, 传感技术联合国家重点实验室, 上海 200050)

²(中国科学院大学材料科学与光电技术学院, 北京 101408)

摘 要 与传统的二维单层细胞相比,细胞球状体的功能更类似于体内细胞,因此在药物筛选和生理病理学研究中受到广泛关注。在低吸附准球形微孔阵列上培养细胞球状体可以实现尺寸可控和形态一致,并具有易于实现高通量的优点。然而,目前制造准球形微孔阵列的工艺通常比较复杂,而且微孔较浅,导致细胞球状体容易从微孔中滑出。针对这些问题,本研究提出一种基于 3D 打印和压印法的聚二甲基硅氧烷(PDMS)微孔阵列制造方法。此方法具有操作简单且成本低等优点,制造出的微孔阵列的直径和间距约为 600 μm ,并具有准球形底部和高约 1000 μm 的侧壁。由扫描电镜图可见微孔的准球形底面表面光滑,微孔底部形状的片内一致性约为 10%,片间一致性约为 5%。对压印过程的研究表明,通过调整微孔间距、薄膜厚度和压印时间等工艺参数可获得更高密度或者更高均一度的阵列。荧光微珠模拟细胞接种实验和流场仿真结果表明,此微孔阵列能够有效减少细胞或细胞球状体从孔中滑出的概率。将此器件应用于细胞球状体的培养,效果良好。本研究提出的制作方法为细胞球状体培养提供了有力工具,在细胞球状体制备和高通量药物筛选等领域具有潜在的应用前景。

关键词 准球形底微孔阵列; 细胞球状体; 3D 打印; 微加工; 微流控

体外细胞培养技术为临床前的药物筛选提供了有效途径。在体外细胞培养模型中,细胞贴附在培养皿表面的模式被称为二维单层细胞培养模型^[1]。在该模型中,培养皿材料提供的生长微环境与体内正常生理环境存在显著差异,这对细胞功能有一定影响^[2-5]。因此,在药物筛选实验中,二维单层模型表现出很高的药物筛选失败率^[6]。细胞球状体(MCSs)是由一种或多种细胞通过细胞之间的粘附力团聚形成的组织^[7],能够模拟体内三维微环境,因此能获得更可靠的生理反应^[8-9]。

产生细胞球状体的关键在于减少细胞与培养皿之间的贴附并增加细胞之间的接触^[10]。目前,有多种方法可用于细胞球状体的培养。例如,将细胞装入绕竖直方向轴旋转的容器中,使细胞悬浮并不断碰撞^[11];将细胞装入悬挂在平板上的液滴中,使细胞聚集在液滴底部^[12];利用微流控通道旁对细胞低吸附的小室捕获细胞,形成细胞球状体^[13]等。微孔法是将含有细胞的悬液放入表面对细胞低贴附、具有准球形底面的微孔中,使细胞在孔底聚集并形成球体。与其它方法相比,微孔法具有对细胞损伤小、操作便捷和易于实现高通量等优点。

微孔底面的曲率和光滑度对细胞球状体的形成过程具有重要影响。底面曲率较小会导致细胞球状体变得扁平,而光滑度较低则会导致细胞不易聚集。传统的微结构制造工艺,如软光刻和 3D 打印,难以制造出光滑的准球形底面。为了解决此问题,已经提出了多种微孔制造方法^[14]。一类方法是使用排列在疏水平板上的冻结小液滴^[15]或多孔板中受热膨胀的气体作为模具,产生具有准球形底部的微孔^[16-17]。这种方法需要控制周围环境,以避免液体挥发或气体膨胀不均匀导致微孔均匀度下降。另一类方法是先加工出平底或者表面粗糙的微孔,然后通过表面处理使微孔底部形成光滑曲面。如 Ma 等^[18]使用数控机床加工微孔阵列,然后通过反复的聚二甲基硅氧烷(PDMS)倒模使表面变得光滑。该方法能制造具有高

2023-03-29 收稿; 2023-05-10 接受

国家重点研发计划项目 (No. 2022YFA1104700) 资助。

* E-mail: wulei@mail.sim.ac.cn; xutiegang@mail.sim.ac.cn; jlzhao@mail.sim.ac.cn

深宽比的微孔,防止细胞从微孔中滑出。然而,反复的 PDMS 倒模比较繁琐,成本较高。此外,还利用激光烧蚀在材料表面直接加工出微孔^[19],但这类方法需要昂贵的设备,并且微孔的形状较难控制。

本研究提出了一种针对细胞球状体培养的准球形底面微孔阵列的制造方法。此微孔阵列具有光滑的准球形底部和高约 1000 μm 的侧壁,微孔的直径和间距约为 600 μm 。具有此高深宽比的结构可有效防止细胞球状体因更换培养基等操作引起的液体流动而从微孔中滑出。在制造用于浇筑微孔阵列的模具时,首先使用 3D 打印技术制作了微柱阵列,然后利用微柱顶端边缘对光敏树脂的钉扎效应和压印法在微柱顶端形成准球状顶部。光敏树脂形成准球状顶部后,在紫外光照射下快速固化。通过实验表征了微孔阵列的均一度、表面的光滑程度以及工艺参数对微孔形状的影响。通过仿真和实验验证了该结构在防止细胞逃逸方面的有效性,并通过在 PDMS 微孔阵列中进行细胞培养,验证了本方法在形成细胞球状体方面的实际效果。本方法将有助于提高实验室中细胞球状体培养的质量与通量,并为高通量药物筛选提供了有力工具。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Form3 3D 打印机(美国 Formlabs 公司); S-4800 场发射扫描电子显微镜(日本日立公司); Heracell VIOS 160i 二氧化碳培养箱(美国赛默飞公司); 精密摇摆摇床(IBAC 北京大橡科技公司); DP80 倒置荧光显微镜和 Fluoview Fv1000 激光共聚焦显微镜(日本奥林巴斯公司)。

ClearV4 光敏树脂(美国 Formlabs 公司); PDMS(Sylgard184,美国道康宁公司); F127 (P2443)、多聚甲醛(158127)和牛血清白蛋白(BSA, A1933)购于美国 Sigma-Aldrich 公司; NCI-H446 细胞株(武汉普诺赛生命科技); 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4, Gibco)、RPMI 1640 培养基(Gibco)、胎牛血清(FBS, Gibco)、100 $\times$ 青霉素-链霉素溶液(Gibco)和细胞核染料 DAPI(D1306)均购于美国赛默飞公司。直径 12 μm 的荧光聚苯乙烯微球(GFM12C,上海辉质生物科技公司); 荧光标记的钙黏蛋白 E 单抗(ab206880,美国 Abcam 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 微孔阵列制造

采用图 1 的加工方法制备具有准球形光滑底面与高深宽比的微孔阵列。图 1A 中的树脂模具由底板和底板上的微柱阵列构成。此模具采用光敏树脂通过 3D 打印技术制造而成。将制备的模具用异丙醇浸泡 12 h,以溶解模具表面残留的树脂;然后用波长 465 nm 的光照射 15 min,增加模具的硬度。

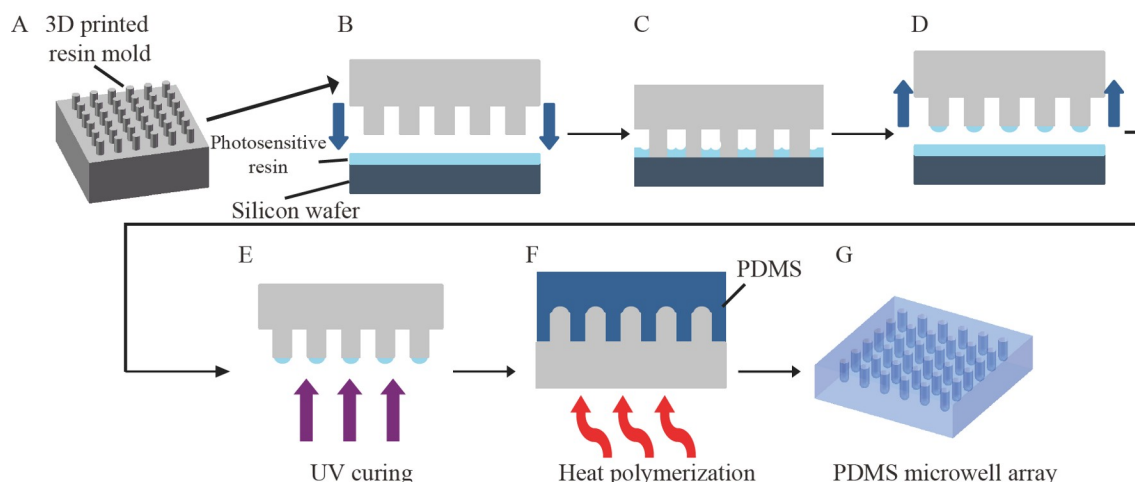


图1 微孔阵列加工流程图

Fig. 1 Flow chart of micro-hole array processing

PDMS: 聚甲基硅氧烷(Polydimethylsiloxane)

如图 1B 所示,硅片首先在 150 °C 的热板上加热 15 min, 去除表面附着的水分,随后进行等离子体表面处理,以提高硅片表面与光敏树脂之间的亲和性,避免在表面张力的作用下光敏树脂厚度变化。在硅片表面滴加光敏树脂,使用匀胶机在硅片表面形成光敏树脂薄膜。硅片上树脂的厚度通过滴加光敏树脂(密度 1.09 g/cm³)前后硅片质量差测量。

将树脂模具阵列朝下放在涂有光敏树脂的硅片上,按压模具,使所有微柱的顶部浸入树脂(图 1C);沿垂直于硅片表面的方向抬起树脂模具(图 1D);保持微柱顶端向下,将模具放在光源上方照射 10 s,使微柱顶端的光敏树脂固化(图 1E)。

将 PDMS 预聚物与固化剂按质量比 10:1 混合。待气泡消除后,将 PDMS 倒在模具上方,在 60 °C 烘箱中加热 12 h(图 1F)。PDMS 完全固化后,将 PDMS 从模具上揭下,得到微孔阵列(图 1G)。

1.2.2 用于微柱阵列压印的装置

为了在压印过程中控制微柱阵列与树脂薄膜之间的夹角以及微柱抬升的速度,并对压印过程进行观察,搭建了实验装置。此装置由光学机械部件组合形成,微柱阵列通过夹持器固定,夹持器安装在支杆和 90° 转换器组合成的可动支架上,可动支架具有两个旋转轴,用于调整微柱阵列平面和硅片平面间的夹角,使两个平面保持平行。可动支架固定在升降杆座上,调节升降杆座上的旋钮改变微柱阵列的高度,使微柱阵列浸入树脂和与树脂分离。硅片两侧有显微镜和光源,可实现压印过程的侧面成像。通过显微镜反馈的实时影像,可以测量微柱平面与硅片平面之间的夹角以及微柱阵列抬升的速度,更准确地控制压印过程。

1.2.3 基于微孔阵列制作细胞球状体培养孔板

使用 3D 打印机将光敏树脂材料打印成无底的 2×3 孔板,孔为方形,孔腔尺寸为 10 mm×10 mm×10 mm(长×宽×深),孔壁厚 3 mm。孔板底部经等离子体处理后涂抹未聚合的 PDMS(10:1, m/m)。采用等离子体处理载玻片,将底部涂抹 PDMS 的孔板放在载玻片上。微孔阵列经等离子体处理后,在底部涂抹少量 PDMS,放入培养孔板的孔中并与孔板贴合,热板 80 °C 固化 2 h。

1.2.4 微孔阵列轴截面形状分析

微孔阵列中各个微孔准球形底部形状的均一程度以及微孔最低点的曲率半径是微孔阵列的重要指标。为定量表征这些指标,需要分析微孔阵列轴截面形状。(1)采用光学显微成像和图像处理方法获得微孔轴截面形状的清晰图。由于制作微孔阵列所使用的 PDMS 具有良好的透光性,很难在光学显微镜下获得清晰的微孔轴截面图像,因此,使用浇筑微孔阵列的树脂模具获得微孔轴截面形状。(2)在树脂模具相邻的两列微柱之间的间隙处切开模具,并将单列微柱放置在光学显微镜下,拍摄微柱的侧面图像。使用 OTSU 二值化算法和泛洪填充算法提高图像中微柱与背景的对比度,并消除部分伪影。从二值化图像中提取微柱的轮廓,并使用位于侧壁上的轮廓点拟合出侧壁的直线方程。通过直线的倾斜角度旋转图像,使所有图像中微柱的方向一致。计算直线与准球形顶部轮廓的交点,通过该交点定位准球形顶部所在的区域,并截取该区域。(3)为了描述不同微孔底部形状之间的差异,计算截取的准球形顶部图像的差分一阶范数。该值与准球状顶部轴截面之间差异部分的面积成正比,可用于量化差异部分,并表征微孔阵列准球形底部形状的均一程度。(4)为了计算微孔最低点的曲率半径,首先对准球形顶部的轮廓进行多项式拟合,然后计算拟合函数在顶点对应自变量值处的曲率。

1.2.5 树脂在微柱上的接触线距树脂薄膜高度的测量

树脂在微柱上的接触线距树脂薄膜高度通过压印过程中从微柱侧面拍摄的光学图像测量得出。微柱周围弯月面之间没有接触时,通过弯月面之间较为平整的区域确定树脂薄膜所在平面,然后测量弯月面在微柱上的接触线到树脂薄膜的垂直距离。微柱周围弯月面之间接触时,先通过此次压印刚开始时拍摄的光学图像测量出树脂薄膜平面到微柱阵列底面之间的距离,再测量弯月面上升过程中微柱上接触线到微柱阵列底面之间的距离,这两个距离的差值即为接触线距树脂薄膜的高度。

1.2.6 细胞培养

将以微孔阵列为底的培养孔板放入 75%乙醇溶液中浸泡 0.5 h,然后在超净台紫外灯下晾干,得到的无菌孔板放到无菌培养皿中保存。为制作抗细胞吸附表面,将 0.5% F127 加入孔板,加满每孔,然后置于

真空干燥器中过夜,使溶液完全填满微孔阵列,并实现 F127 包被。吸去 F127 溶液,依次用 PBS 和 RPMI 1640 完全培养基 (10% FBS, 1% 青霉素-链霉素) 冲洗培养孔,每孔加入 160 μL 小鼠肺癌细胞 NCI-H446 悬液 (4.0×10^6 cell/mL)。轻轻摇晃培养孔板,使细胞均匀落入微孔中,然后放入二氧化碳培养箱培养。

1.2.7 微球从不同深度微孔中滑出的检测

采用直径 12 μm 绿色荧光聚苯乙烯微球 (密度 1.05 g/cm^3) 代替细胞,将 120 μL 1.2×10^6 particle/mL 的微球悬液加入每个培养孔。培养孔板放置于精密摇摆床上横竖交替摇晃各 20 次 (摇摆范围: $\pm 10^\circ$; 摇摆速度: $1000^\circ/\text{min}$)。采用荧光显微镜对培养孔板底部成像。

1.2.8 细胞免疫荧光染色

移去培养孔板中的培养基,用 PBS 清洗细胞球状体 3 次,加入 4% 多聚甲醛固定 15 min 后,用 PBS 清洗细胞球状体 3 次,加入 3% BSA 均匀覆盖细胞,室温封闭 30 min。用 PBS 按照一定比例稀释荧光标记的钙黏蛋白 E 单抗,覆盖细胞球状体,4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜。采用 DAPI 染液复染细胞核,室温条件下避光孵育 10 min,移去溶液并加入 PBS 清洗,采用激光共聚焦显微镜进行观察拍照。

2 结果与讨论

2.1 准球形微柱阵列模具的设计及制备工艺的优化

微柱阵列结构如图 1A 所示,微柱为圆柱形,按照线性阵列排列。阵列的两个方向与微柱的底面平行,夹角为 90° ,从而使对不同微孔的定位更加直观。根据常见的细胞球状体的大小和 3D 打印机的打印精度,设计微柱直径在 400~1000 μm 之间。为减少细胞从微孔中逃逸的情况,并考虑微柱高宽比对加工优良率的影响,设计微柱高度为 1000 μm 。

准球形结构形成原理如图 2A-1 所示。当微柱的上部浸在树脂薄层中时,由于表面张力,树脂沿着微柱的侧壁向上移动,在侧壁和树脂薄层之间形成弯月面。相邻微柱之间的弯月面仅有较少的接触。随着微柱开始上升,侧壁上的树脂接触线向下移动,到达顶面的边缘。由于此时树脂和微柱顶面之间的接触角比树脂的后退接触角大,接触线保持在顶面边缘。随着微柱继续提升,接触角逐渐减小,导致围绕相邻微柱的弯月面之间的距离增加,弯月面的中间部分变薄。最终,由于 Plateau-Rayleigh 的不稳定性,弯月面断裂,留在柱子顶部的树脂在表面张力的影响下恢复为准球形。

结构与工艺参数会对上述形成过程产生影响。实验结果表明,参数设计不当会使得微柱之间相互干扰,如图 2A-2 所示。在这种情况下,相互干扰的微柱之间的弯月面紧密接触,导致微柱被抬起时,弯月面的断裂位置向微柱之间的区域移动。当微柱间距较小时,由于毛细效应,断裂后留在微柱上的树脂进入微柱的间隙;当微柱间距较大时,由于微柱的倾斜或微柱阵列的滑动,微柱一侧下方的树脂先于另一侧微柱下方的树脂断裂,导致断裂点下方的树脂汇聚到另一侧的微柱下方,增加了该位置的树脂体积和断裂高度。

实验结果表明,为减小阵列中不同微柱下弯月面断裂时断裂点相对于微柱的位置的偏差,微柱抬升时,微柱阵列平面与硅片平面之间应尽量保持平行;微柱间弯月面接触较多时,微柱间较容易发生干扰。如图 2B 所示,随着微柱浸入树脂薄膜的时间延长,树脂在微柱侧壁上的接触线升高,相邻微柱之间的弯月面也逐渐靠近。图 2C 展示了当弯月面的接触线在不同的微柱间距下发展到距树脂薄膜不同高度时,微柱阵列升起过程中微柱之间的干扰情况。当接触线距树脂薄膜高度相同时,增加微柱间距可以减少微柱之间的干扰。接触线距树脂薄膜高度与微柱和树脂薄膜的接触时间以及树脂薄膜厚度相关,图 2D 显示了不同树脂薄膜厚度下弯月面接触线高度随时间的变化曲线,减少接触时间和减小树脂薄膜厚度可以降低侧壁弯月面接触线的高度,从而减少微柱之间的干扰。图 2E 展示了微柱间发生干扰时,阵列一致性严重下降,互不干扰的情况下薄膜厚度设为 246 μm ,互相干扰的情况下薄膜厚度设为 330 μm ,微柱间距均为 600 μm 。

可以通过多种方式减少微柱之间的干扰,例如增加微柱间距、减小薄膜厚度或者减少压印时间。然而,增加微柱间距会导致阵列密度降低;减小薄膜厚度则需要打印更精确的微柱阵列和更平整的树脂薄

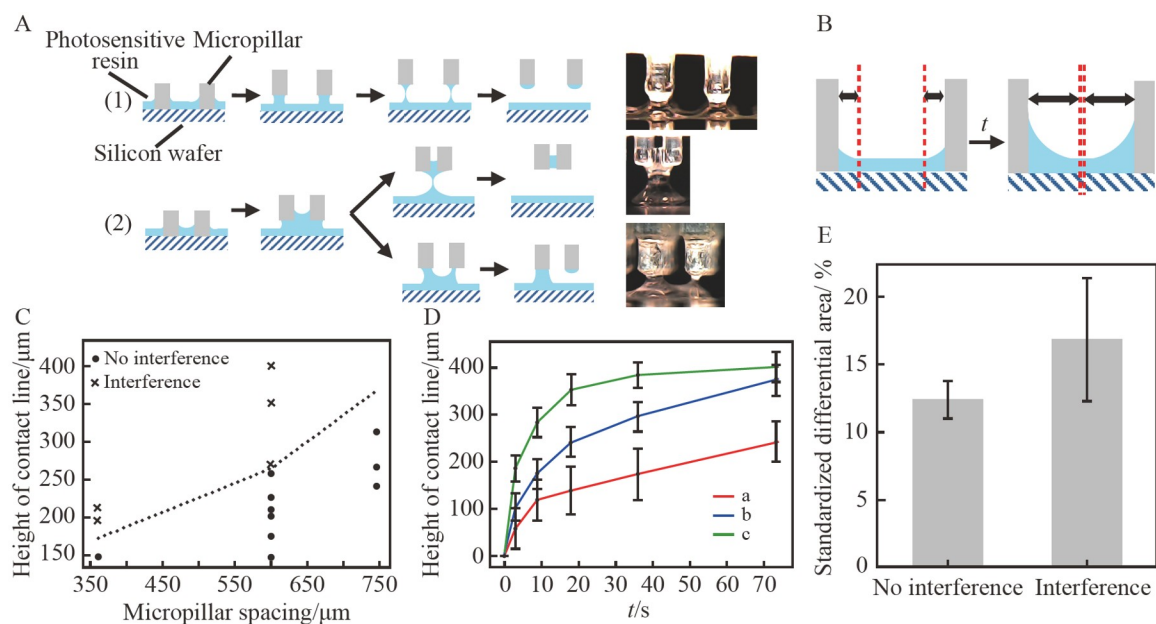


图2 (A)微柱阵列与光敏树脂薄膜分离过程的示意图和侧面光学成像照片;(B)微柱周围弯月面随时间变化示意图;(C)不同微柱间距和接触线距树脂薄膜不同高度时,微柱间相互干扰的情况;(D)树脂薄膜厚度不同(a: 190 μm ; b: 246 μm ; c: 330 μm)时,接触线距树脂薄膜高度随时间变化情况;(E)微柱间互不干扰与相互干扰时,微孔阵列任意两微孔间准球形底部轴截面平均差异面积情况

Fig.2 (A) Schematic diagram and side optical imaging of separation process between micro-pillar array and thin layer of photosensitive resin; (B) Schematic diagram of the change of the meniscus around micro-pillar with time; (C) Interference between the micro-pillars at different micro-pillar spacings and different heights of contact line from resin film; (D) Change of the height of the contact line from resin film with time for different thicknesses of resin film (a: 190 μm ; b: 246 μm ; c: 330 μm); (E) Average difference area of quasi-spherical bottom axial cross section between any two micropillars of the array when they interfere with each other or not

膜,以确保在压印过程中所有微柱与树脂充分接触;而过短的压印时间会增加操作复杂度并影响操作稳定性。

为较稳定地制备具有较高均一度的准球形顶部结构,首先,选择 15 s 的压印时间和 246 μm 的树脂薄膜厚度,以在获得较低的接触线距树脂薄膜高度的同时保证压印操作有充足的时间且容易实施。然后,通过图 2D 的结果,得到接触线距树脂薄膜的高度约为 200 μm 。根据该高度和图 2C 数据,得到微柱间距应大于 450 μm 。考虑到曲线的测量误差与加工过程中可能产生的误差,最终选择 600 μm 作为微柱间距。此外,由于用于微柱阵列抬升的装置存在装配误差,实验中微柱抬升时微柱阵列平面与硅片平面之间的夹角约为 1° 。

2.2 微孔阵列加工结果

为验证所提出的微孔阵列制备方法的有效性,根据 2.1 节的优化参数制备了若干微孔阵列,并对微孔底部的光滑度、准球形底部形状的均一度、微孔底部轴截面的面积以及最低点曲率等进行表征,这些特性会对细胞的聚集过程以及细胞球的形状和均匀性产生影响。微孔阵列准球形底部形状的均一度通过不同微孔底部轴截面的差异部分面积量化表征。

图 3A 展示了用于浇筑微孔阵列的模具,其中,微柱的直径、间距以及微柱和底板之间的夹角与设计相符。由于加工精度的影响,微柱与底板的连接处形成了圆角,并且底板表面比较粗糙。这些圆角会增加微孔入口的面积,使得细胞球更易落入微孔中;底板表面的粗糙程度对微孔内的细胞培养过程没有明显的影响。

利用扫描电子显微成像技术对微孔的光滑程度进行了表征。由于微孔具有高深宽比,直接观察内部较为困难,因此使用模具代替微孔阵列进行表征。如图 3B 显示,准球形顶部表面光滑。微柱侧壁有光敏

树脂润湿固化后形成的薄层,此薄层覆盖了微柱上部的打印层纹,使微柱侧壁更加光滑。利用光学显微镜对微孔阵列的片内一致性和片间一致性进行了图像表征分析(图 3C~3E)。首先通过轴截面差异部分的面积量化准球形底形状之间的差异,然后通过除以阵列中准球形底轴截面的平均面积进行标准化。为观察各个微孔底部形状之间的差异情况,通过灰度值展示了一个典型微孔阵列中任意两个微孔的准球形底轴截面的差异面积,如图 3C 所示,较高的差异值聚集在矩阵的某几列(行)中,例如第 1、3 和 17 列(行)等,对应于编号为 1、3 和 17 的微孔,说明这些异常微孔对其它通常微孔表现出高差异性,而通常微孔之间则表现出较低差异性。此外,异常微孔之间大部分也表现出低差异性,说明这些异常微孔在形成过程中受到了类似的干扰。为观察微孔底部的形状差异与微孔位置之间的关系,计算了典型阵列中一个微孔与阵列中所有微孔的准球形底轴截面差异面积的均值,并将均值按照微孔在阵列中的位置进行排列,如图 3D 所示,具有较高平均差异的微孔分布在靠近阵列边界的位置。这种现象可能由模具压印过程中阵列边界处的非对称边界条件引起。图 3E 展示了 6 个阵列中准球形底轴截面差异部分面积的数据分布情况。阵列中微孔底的轴截面差异部分面积的均值和中位数都约为轴截面的平均面积的 10%,离群值由异常微孔产生。图 3F 展示了微孔准球形底的轴截面平均面积和底部最低点的曲率半径,结果表明,平均面积和曲率半径的均值分别为 $50000 \mu\text{m}^2$ 和 $450 \mu\text{m}$,不同阵列之间的轴截面平均面积和底部曲率半径之间存在约 5% 的偏差,这种偏差可以归因于微柱阵列在压印过程中的抬升速度不同。Wei 等^[20]提出了单根圆柱形微柱从液池中抬升时夹带的液体体积与毛细数之间的关系曲线。在该研究中,微柱阵列抬升的速度在 1~10 mm/s 之间。根据所使用的光敏树脂中质量比约为 70% 的双甲基丙烯酸尿烷酯的资

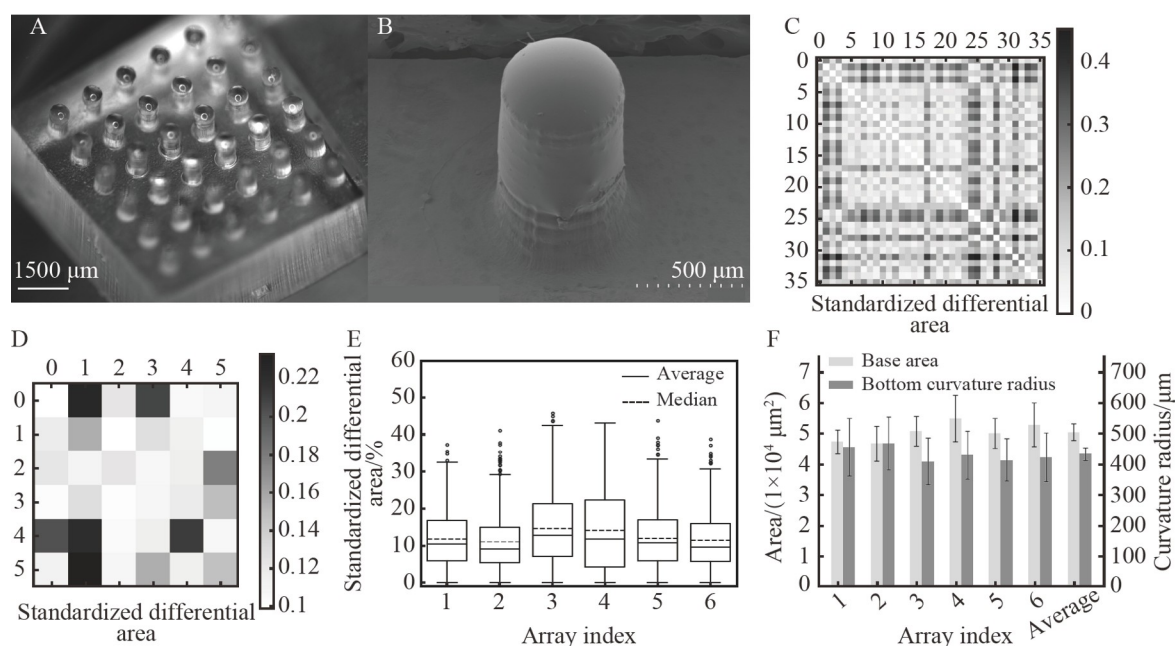


图3 (A)用于浇筑微孔阵列的微柱阵列模具;(B)具有准球形顶部的微柱的扫描电子显微成像照片;(C)典型微孔阵列任意两微孔间准球形底部轴截面的标准化差异面积矩阵;(D)典型微孔阵列任意位置上准球形底部轴截面的平均标准化差异面积矩阵;(E)不同微孔阵列任意两微孔间准球形底部轴截面的标准化差异面积箱线图;(F)不同微孔阵列准球形底部平均轴的截面面积和平均最低点曲率半径以及阵列间均值

Fig.3 (A) Micropillar array mold for casting microwell arrays; (B) Scanning electron micrograph of a micropillar with a quasi-spherical top; (C) Standardized difference area matrix of quasi-spherical bottom axial cross-section between any two microwell holes of a typical microwell array; (D) Average standardized difference area of quasi-spherical bottom axial cross-section at any position of a typical microwell array matrix; (E) Box line plot of the standardized difference area of the quasi-spherical bottom axial cross-section between any two microwells of different arrays; (F) Average axial cross-sectional area and average radius of curvature of the lowest point of the quasi-spherical bottom of different microwell arrays and the inter-array mean value

料估计,所使用光敏树脂的表面张力和粘度分别约为 52 mN/m 和 $8 \text{ pa}\cdot\text{s}$,因此,抬升过程中毛细数在 $0.015\sim 0.15$ 之间。根据 Wei 等^[20]得出的曲线,夹带体积的变化约为 7% ,与本实验结果相近。微孔底部曲率半径的方差对均值的比值略大于面积,这可能是因为曲率半径通过轮廓测量,相较于面积更易受到成像质量和局部缺陷的影响。

2.3 高深宽比结构对防止细胞或细胞球从微孔中逃逸的作用

在细胞培养过程中,吸取过量悬液或更换培养基等处理方式会导致微孔阵列上发生快速液体流动,进而导致微孔中的细胞或细胞球逃离微孔,使得细胞球丢失。

图 4A 展示了将相同数量的绿色荧光聚苯乙烯微球添加到具有不同深度、相同孔径的微孔阵列表面,施加相同的流场后在以微孔中心为圆心的不同直径的圆形区域内,残留在孔外的微球的数量。实验结果表明,对于不同直径的圆形区域,残留微珠的数量随着孔深度的增加而总体呈现减少的趋势。由于微孔的孔径相同,微球随液体流动进入孔中的概率基本相同,因此孔周围微球数量的差异可以归因于微球在流体作用下从孔中滑出。结合上述分析,该结果表明落入深度较大的微孔中的细胞在液体流动的作用下从孔中逃逸的概率较小。值得注意的是,当圆形区域直径增大时,不同深度微孔外残留微珠的数量趋于一致。出现此现象的原因是通过摇晃施加的流速方向与微孔阵列的两个延伸方向平行导致阵列间隙中的微珠在随液体运动的过程中没有受到微孔的影响。通过改变流速方向与阵列延伸方向间的夹角或者改变阵列的两个延伸方向间的夹角可以提高微孔对微珠的捕获率。图 4B 展示了以不同深度微孔中心为圆心的直径 $700 \mu\text{m}$ 的圆形区域内的荧光图像,内侧白圈内部是微孔所在区域,外侧白圈表示直径 $700 \mu\text{m}$ 的圆形区域的边界。由图 4B 可见,深度较小的微孔中微珠的散布范围更大,表明深度较小的微孔内的微珠更难在微孔底部聚集。通过多物理场有限元分析软件 COMSOL Multiphysics 的层流模块得到的不同深度下,包含细胞球状体的微孔阵列内流场的模拟结果如图 4C 所示。用十字符号标记的球体用

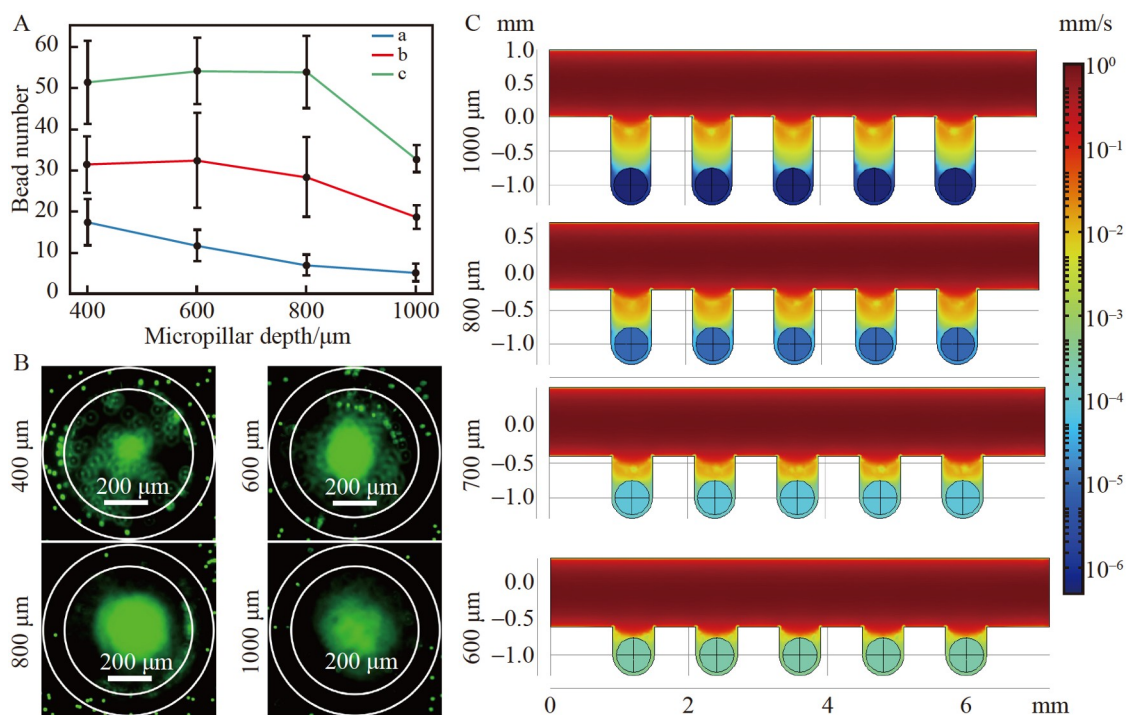


图4 (A) 相同流场条件下,以不同深度微孔中心为圆心,不同直径(a: $700 \mu\text{m}$; b: $800 \mu\text{m}$; c: $900 \mu\text{m}$)的圆形区域内,残留在孔外的荧光微球数量;(B)以不同深度微孔中心为圆心,直径 $700 \mu\text{m}$ 的圆形区域内,荧光微珠的分布情况;(C)不同深度的微孔阵列中流速仿真结果

Fig.4 (A) The number of fluorescent beads remaining outside the microwells in a circular area of different diameters (a: $700 \mu\text{m}$; b: $800 \mu\text{m}$; c: $900 \mu\text{m}$) with the center of the microwells at different depths at the same flow rate; (B) Distribution of fluorescent beads in a circular area of $700 \mu\text{m}$ diameter with the center of the microwells at different depths; (C) Simulation results of the flow rate in micropore arrays at different depths

于模拟细胞球状体,微孔上方的平均流速为 1 mm/s,方向为从左到右。模拟结果表明,上下游微孔中的流场差异较小,位于深度为 1000 μm 的微孔底部的细胞球周围的流速介于 $10^{-3}\sim 10^{-4}$ mm/s 之间。这表明细胞球状体在流场中受到的抬升力较小,不容易在液体流动的作用下从孔口逃逸。相比之下,位于深度为 400 μm 的微孔底部的细胞球状体周围的流速约为 10^{-1} mm/s。

2.4 不同孔径微孔的制作和细胞球状体培养

不同孔径的微孔可用于培养不同大小的细胞球体。为了检验此微孔阵列制备方法在制备不同孔径的微孔阵列方面的有效性,考察了微柱半径和压印产生的准球形顶部顶端曲率半径的关系,压印所用的树脂薄膜厚度约为 250 μm 。实验结果如图 5A 所示,曲率半径与微柱直径呈正相关,并且变化速率随微柱直径增加而增大,这表明此微孔阵列制备方法在制备大直径微孔时性能有所下降。图 5B 展示了孔径为 500、700 和 900 μm 的 PDMS 微孔的侧面图像和培养过程中的细胞球状体。结果表明,细胞在上述尺寸的微孔中都能团聚形成球状体,直径较大的微孔可以容纳更多的细胞,形成直径更大的细胞球状体。

为了评价所制作的微孔阵列用于细胞球状体培养的效果,在以微孔阵列为底的孔板中培养人小细胞肺癌细胞 NCI H446。微孔阵列的孔径和间距为 600 μm ,深度为 1000 μm 。采用的细胞球状体培养孔板如图 5C 所示,实验结果如图 5D 所示。将 NCI H446 接种在此孔板中,接种 1 d 后,已经在微孔中团聚成球状体,一致性良好;培养 1 d 后,细胞紧密抱团成均匀的球状体,如图 5D 所示。除了微孔中,孔板底部其它地方未见有细胞生长,说明 F127 处理有效地防止了细胞吸附,细胞都聚集到微孔中。免疫荧光共聚焦成像结果如图 5E 所示,NCI H446 细胞球状体大量表达上皮标志蛋白(钙粘蛋白 E),说明此细胞球状体可进行与钙粘蛋白 E 相关的病理研究和药物筛选研究。在这些研究中,既可以在培养孔板中进行原位免疫荧光检测,也可以将培养孔板的溶液取出进行生化检测分析^[21]。

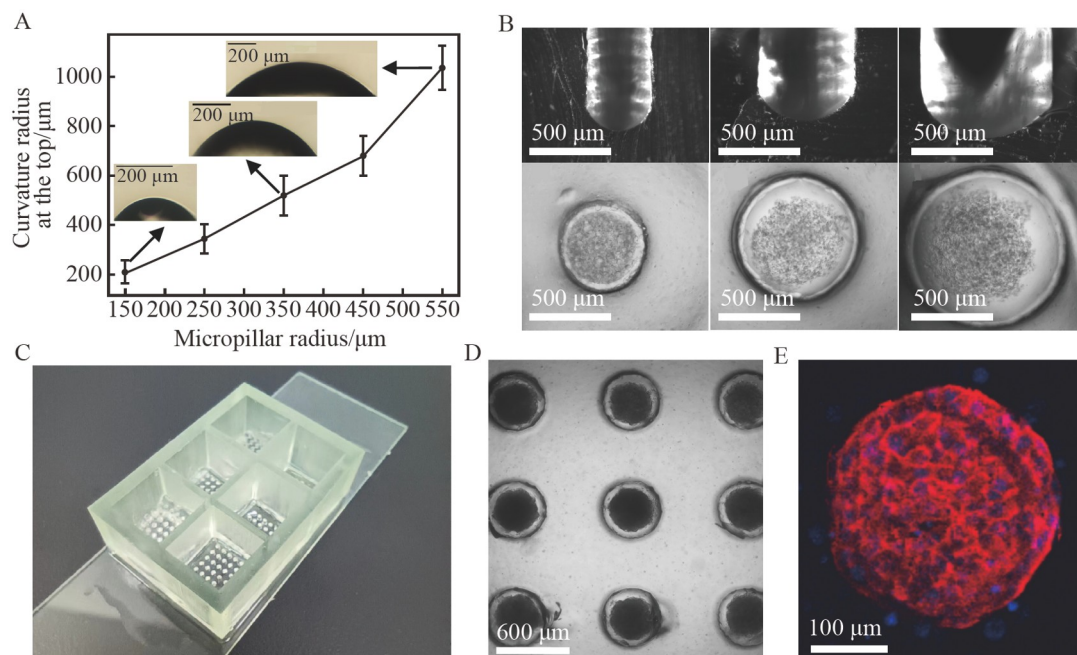


图5 (A)微柱准球状顶部顶端的曲率半径与微柱半径的关系;(B)不同直径PDMS微孔的侧面光学显微成像照片和微孔中培养的细胞球状体照片;(C)细胞球状体培养孔板;(D)培养过程中的细胞球状体阵列;(E)细胞球状体免疫荧光照片(红为钙粘蛋白E;蓝为细胞核)

Fig.5 (A) Radius of curvature of the top tip of micropillar quasi-sphere in relation to the radius of micropillar; (B) Lateral optical micrographs of PDMS micropores of different diameters and photographs of cell spheroids cultured in microwells; (C) Cell spheroid culture well plate; (D) Cell spheroid arrays during culture; (E) Immuno fluorescence staining photograph of cell spheroid (Red is E-cadherin, and blue is cell nucleus)

3 结论

建立了一种基于 3D 打印和压印技术制备微孔阵列的方法,可用于设计不同间距、孔径和深度的微孔阵列。这种具有类球形底部的微孔阵列可应用于实验室中细胞球状体培养。与类似的微孔阵列制备方法相比,本方法的操作难度显著降低,并且制备的微孔阵列仍具有表面光滑、通量高和可防止细胞球体逃逸的特点。考察了微柱间距、树脂薄膜厚度、压印时间对压印过程的影响。然而,本研究所提出的制备方法在片间一致性等方面仍需进一步改进。这些偏差可归因于微柱抬升速度、残留树脂在微柱侧壁上的薄壁效应等因素的影响。此外,在研究微柱间的相互干扰时,仅考虑了微柱附近弯月面产生的影响,并未考虑树脂薄层整体的形变。通过研究树脂薄层整体的形变,有可能对阵列边缘微孔与内部微孔之间的差异做出更具体的解释。

References

- [1] ANTONI D, BURCKEL H, JOSSET E, NOEL G. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, 16(12): 5517-5527.
- [2] CESARZ Z, TAMAMA K. *Stem Cells Int.*, 2016, 2016: 9176357.
- [3] WILSON P D. *Am. J. Physiol.*, 1997, 272(4): F434-F442.
- [4] KLEINMAN H K, PHILP D, HOFFMAN M P. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2003, 14(5): 526-532.
- [5] ACHILLI T M, MEYER J, MORGAN J R. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2012, 12(10): 1347-1360.
- [6] HUTCHINSON L, KIRK R. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2011, 8(4): 189-190.
- [7] DUGUAY D, FOTY R A, STEINBERG M S. *Dev. Biol.*, 2003, 253(2): 309-323.
- [8] FENNEMA E, RIVRON N, ROUWKEMA J, VAN BLITTERSWIJK C, DE BOER J. *Trends Biotechnol.*, 2013, 31(2): 108-115.
- [9] JARVINEN P, BONABI A, JOKINEN V, SIKANEN T. *Adv. Funct. Mater.*, 2020, 30(19): 2000479.
- [10] GRINNELL F, FELD M K. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1981, 15(3): 363-381.
- [11] FOTY R A, STEINBERG M S. *Dev. Biol.*, 2005, 278(1): 255-263.
- [12] KELM J M, TIMMINS N E, BROWN C J, FUSSENEGGER M, NIELSEN L K. *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, 83(2): 173-180.
- [13] HSIAO A Y, TORISAWA Y, TUNG Y C, SUD S, TAICHMAN R S, PIENTA K J, TAKAYAMA S. *Biomaterials*, 2009, 30(16): 3020-3027.
- [14] GUO W, CHEN Z, FENG Z, LI H, ZHANG M, ZHANG H, CUI X. *Micromachines*, 2022, 13(9): 1555.
- [15] LIU T, WINTER M, THIERRY B. *Biomaterials*, 2014, 35(23): 6060-6068.
- [16] IANG U B T, JONES M C, KAULE M J, VIRGILE C R, PU Qi-Hui, DELOUISE L A. *Biomed. Microdevices*, 2014, 16(1): 55-67.
- [17] KIM D, KIM K, PARK J Y. *Lab Chip*, 2021, 21(10): 1974-1986.
- [18] MA L D, WANG Y T, WANG J R, WU J L, MENG X S, HU P, MU X, LIANG Q L, LUO G A. *Lab Chip*, 2018, 18(17): 2547-2562.
- [19] WU K W, KUO C T, TU T Y. *Glob. Challenges*, 2021, 5(2): 2000056.
- [20] WEI X, RIVERO-RODRÍGUEZ J, ZOU J, SCHEID B. *J. Fluid Mech.*, 2021, 922: A14.
- [21] TIAN T, HO Y, CHEN C, SUN H, HUI J, YANG P, GE Y, LIU T, YANG J, MAO H. *Chin. Chem. Lett.*, 2022, 33(6): 3167-3171.

Rapid Processing Method of Quasi-spherical-Bottom Microwell Arrays for Cell Spheroid Culture

ZHANG Guo-Yuan^{1,2}, WU Lei^{*1,2}, PENG Xi-Yao^{1,2}, GE Yu-Qing^{1,2}, LIU Ting¹, XU Tie-Gang^{*1},
ZHAO Jian-Long^{*1,2}

¹(State Key Laboratory of Transducer Technology, Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China)

²(College of Materials Science and Opto-Electronic Technology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China)

Abstract Compared to traditional two-dimensional monolayer cells, cell spheroids have functions that more closely resemble cells *in vivo* and are therefore increasingly being studied in drug screening and physiopathology. Culturing cell spheroids on low-adhesion quasi-spherical microwell arrays can achieve size controllability and morphological consistency, and also has the advantage of easy implementation of high throughput. However, the current process for manufacturing quasi-spherical microwell arrays is usually complex and the micropores are shallow, making it easy for cell spheroids to slip out of the micropores. In response to these issues, this work proposed a polydimethylsiloxane (PDMS) microwell array fabrication method based on 3D printing and imprinting. This method had the advantages such as simple operation and low manufacture cost. The diameter and spacing of the fabricated microwell array were about 600 μm , with quasi-spherical bottoms and sidewalls about 1000 μm in height. Scanning electron microscopy analysis showed that the quasi-spherical bottom surface of the micropore was smooth. Microscopic image analysis showed that the intra-chip consistency of the micropore bottom shape was approximately 10% and the inter-chip consistency was approximately 5%. Researches on the imprinting process showed that higher density or higher uniformity of the array was achieved by adjusting processing parameters such as micropore spacing, membrane thickness and imprinting time. Fluorescent bead simulation cell inoculation experiments and flow field simulation results showed that this microwell array could effectively reduce the probability of cells or cell spheroids slipping out of the micropores. Finally, this device was applied to the cultivation of cell spheroids with good results. In conclusion, the developed fabrication method provided a powerful tool for cultivating cell spheroids and had application potentials in the areas of cell spheroid production and high-throughput drug screening, etc.

Keywords Quasi-spherical-bottom microwell arrays; Cellular spheroids; 3D printing; Microfabrication; Microfluidics

(Received 2023-03-29; accepted 2023-05-10)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2022YFA1104700).