

三维微纳米制造技术在癌症生物物理研究中的应用

鲁金蕾 王晓晨 容晓晖 刘雳宇

3D micro/nano fabrication and its application in cancer biophysics

Lu Jin-Lei Wang Xiao-Chen Rong Xiao-Hui Liu Li-Yu

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 64, 058705 (2015) DOI: 10.7498/aps.64.058705

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.64.058705>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2015/V64/I5>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

心率变异性分析在新生儿疼痛检测中的应用

[Application of heart rate variability analysis to pain detection for newborns](#)

物理学报.2014, 63(20): 208704 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.63.208704>

心磁信号广义S变换域奇异值分解滤波方法

[A method for magnetocardiograms filtering based on singular value decomposition and S-transform](#)

物理学报.2013, 62(14): 148702 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.148702>

专题: 癌症生物物理

三维微纳米制造技术在癌症生物物理研究中的应用*

鲁金蕾 王晓晨 容晓晖 刘雳宇†

(中国科学院物理研究所, 软物质重点实验室, 北京 100190)

(2014年11月18日收到; 2014年12月16日收到修改稿)

癌症致命的主要原因是癌细胞在临床上的转移性. 癌细胞的侵袭和转移是一个非常复杂的三维过程, 但现有的癌症研究在活体上有诸多观测和操作上的困难. 而体外实验又通常在培养皿中进行, 其二维的生长环境已完全不能满足对癌细胞空间转移性的深入研究, 故在活体外构建出癌细胞侵袭和转移的三维物理模型具有十分重要的意义. 然而如何在体外尽可能真实地模拟体内癌细胞的生长微环境一直是困扰科学家的难题. 本文系统介绍了三维微纳米制造的几种主流技术, 探讨了它们在癌症生物物理研究中的应用和发展. 在此基础上为了在未来实现对体外三维模型的制造、观测和精确操作, 文章还创新性地提出了一种结合紫外线固化生物型水凝胶的三维成型技术、光片三维成像技术以及微纳米探针控制技术的一体化研究平台. 这些先进的技术和理念, 势必会逐步升级现有传统的癌症研究手段, 为未来理解和治疗癌症揭开全新的篇章.

关键词: 三维微纳米制造技术, 3D生物打印, 体内微环境, 生物物理**PACS:** 87.19.xj, 87.80.-y, 87.85.J-, 87.18.Gh**DOI:** 10.7498/aps.64.058705

1 引言

癌症已逐渐成为21世纪对人类健康最具威胁的疾病^[1]. 相比于其他疾病癌症的致死率很高, 其致命的主要原因是癌细胞具有很强的转移性. 调查显示, 90%的癌症患者死亡都是源于癌细胞的侵袭和转移. 侵袭是指肿瘤发展到一定程度后, 癌细胞脱离原来的肿瘤位置, 入侵和破坏周围细胞外间质组织(extracellular matrix, ECM)的过程. 转移是指它们穿破血管壁或淋巴壁, 随血液或淋巴液迁移到身体其他部位继续繁殖, 破坏更多的人体器官和组织, 最终造成病人死亡的过程. 由于癌细胞转移的部位异常随机和分散并且牵涉血管、淋巴管以及多个组织, 故手术、化疗或药物等方法都很难达到良好的治疗效果, 因此癌症一旦转移就很难治愈.

癌细胞侵袭是癌症扩散的第一步和标志. 当肿

瘤完整还没有发生侵袭时是可以通过手术成功切除且基本不会威胁生命的. 但是受当今医疗资源的限制, 加上人们对自身健康的不重视, 癌症通常都是在癌细胞脱离肿瘤发生侵袭后才被发现. 而此时由于细胞侵袭组织的多向性及广泛性, 手术治疗已基本不可能, 病人只能接受药物、放疗等治疗方法, 进入向死亡接近的道路. 可以说, 侵袭是癌症从不致命转向致命的分界线. 那么研究侵袭中癌细胞侵袭的路径、模式、速度、细胞变化(及癌细胞)与侵袭环境关联等规律在发生侵袭后的癌症临床治疗中就显得尤为重要.

纯生物和医学的领域通常关注的是癌细胞的内部调控(包括基因的变异, 蛋白分子机理的调控, 染色体变化)对细胞的影响, 或者是癌症在临床上的表现和治疗. 而癌细胞的侵袭是生物层面上典型的集体行为, 侵袭的路径、模式、速度、细胞变化及其与侵袭环境的关联是大于癌细胞尺度的研究, 是

* 国家重点基础研究发展计划(批准号: 2013CB837200)和国家自然科学基金(批准号: 11474345)资助的课题.

† 通信作者. E-mail: liu@iphy.ac.cn

生物和医学研究所不涉及的领域. 所以应用物理的手段研究癌细胞在侵袭过程中的动态行为, 以及其在微环境的刺激(如药物, 生长因子)下自身侵袭模式的变化非常有必要. 另外, 癌细胞的变异具有很强的个体性差异, 只有建立模型去统计和定量地认识、研究癌细胞的特性才可以得到具备一定普适性的结论.

在传统的癌症研究中研究人员通常只能用小白鼠做实验, 肿瘤及癌症的发展状况需要通过活体切片才能了解. 这不仅费时费力, 最重要的是切片为静态结果, 并不能反推得到细胞侵袭过程中各种模式的成因和发展. 另外广泛使用于传统意义癌细胞研究中的培养皿, 始终存在不能模拟人体内癌细胞生长的三维环境的缺陷. 肿瘤的产生、癌细胞的转移以及细胞外间质组织中成纤维细胞的繁殖都是在三维空间中发生的, 研究已经证实细胞在二维和三维空间中, 在生物行为和细胞形态上通常存在巨大的差异^[2]. 根据上述讨论, 要研究肿瘤细胞的侵袭行为最好可以通过在体外建立物理模型, 模拟人体内癌细胞侵袭的微环境^[3], 在微米尺度对细胞群侵袭的方式、形态和空间位置进行连续观测, 定量研究细胞集体行为和侵袭机理. 并且最好可以对微环境进行实时监测和控制, 研究环境改变对于侵袭的影响^[4]. 这项重任可以由三维微纳米制造技术结合三维生物成像来担当和实现.

三维制造技术是一种以数字模型文件为基础, 运用可粘合材料在三维空间上将模型实体化的技术, 过去其常被用于模具制造、工业设计等生产加工阶段, 后来随着技术的成熟可以被用来直接制造成品. 而三维打印技术(又称3D打印)作为三维制造技术的一种, 是采用分层加工、叠加成型的方式逐层增加材料来生成三维实体的方法^[5-7], 现正被广泛用于各个领域. 生物物理学家们通过优化三维制造技术或3D打印技术在体外初步建立起可以模拟体内微环境的三维微纳米结构, 研究了细胞群的生长方式^[8]、相互作用以及迁移特点^[4]并取得了阶段性成果. 优化后的这些技术更适合用于生物医学领域, 帮助人们在体外建立三维微纳米结构模拟体内微环境, 在微米尺度对细胞群的侵袭方式、侵袭机理进行研究, 同时也为深入了解癌症的致命机理, 开辟癌症治疗的新思路打下基础.

2 三维微纳米制造技术

以下介绍几种现阶段广泛用于生物物理领域的三维微纳米制造技术, 并举例说明其制造出的三维微纳米结构在研究微流体、细胞的转移、细胞间相互作用以及细胞-环境间相互作用中的应用, 并在此基础上分析其在癌症生物物理研究中的应用前景.

2.1 PDMS 模塑法

首先, 最简单直接的也是人们最早想出来的方法是利用模具来加工三维结构. 较早期, 研究人员使用刻蚀了的玻璃和硅片作为模具, 然后经过倒模形成简单的三维结构用于微流体芯片的制作和微流体系统的研究. 微流体系统是指特征尺寸在10到100 μm 之间可控制液体或气体流动的装置, 多数用于化学分析、生物医学等研究领域. 经过20多年的研究和发展, 微流体芯片的加工工艺已经发展得较为成熟. 现在实验室中常用到的加工材料是聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS). PDMS原本是一种黏稠透明状液体, 在与适量助凝剂混合之后便可凝固成形, 这些性质使得PDMS具有加工快、成本低、易封装等特点, 除此之外它还具有良好的透气性和生物兼容性. 近些年随着3D打印技术的发展更可以将模具直接打印出来, 进一步简化了PDMS芯片的制作工序. 图1介绍了Germán Comina等人(2013年)使用商业化3D打印机在20 min之内打印出精度大约为50 μm 的模板, 经PDMS倒模制成液体混合芯片, 用以研究不同结构的混合通道对液体的混合效果^[9]. 该技术所使用的3D模板平均每个仅0.48美元, 并且可以重复使用, 制作出的微流体管道也能够充分保留原有的设计细节. 因此, Germán Comina等人的研究为快速加工更为复杂的PDMS芯片或结构提供了一种很好的思路.

另外, 由于PDMS具有良好的生物兼容性, 微流体芯片又具有与细胞大小(10 μm 量级)相近的特征尺寸(10 μm 到100 μm), 这就使得PDMS芯片非常适合用于细胞生物学研究领域. 在这方面已经有研究人员利用PDMS在体外构建出特殊的三维微结构用于癌细胞在这些结构中的运动及生长特性的研究. 图2显示Kuo等人使用三维

PDMS 芯片研究人乳腺癌细胞 (MCF-7) 在特定趋化因子分布下的三维转移特性^[10]. 首先他们在芯片底部的胶原蛋白中成功实现细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF, 能促进细胞的增殖分化)浓度的线性分布, 随后将细胞团置入到带有纳米小孔阵列的薄膜上层使其处于 EGF

浓度梯度下, 连续观察6天的结果表明在三维结构中 MCF-7 在细胞 EGF 浓度梯度的作用下表现出一种明显的定向迁徙的特点. 基于该三维转移芯片可以在光学显微镜下很方便地研究不同种肿瘤细胞在不同细胞趋化因子的作用下的迁徙特点.

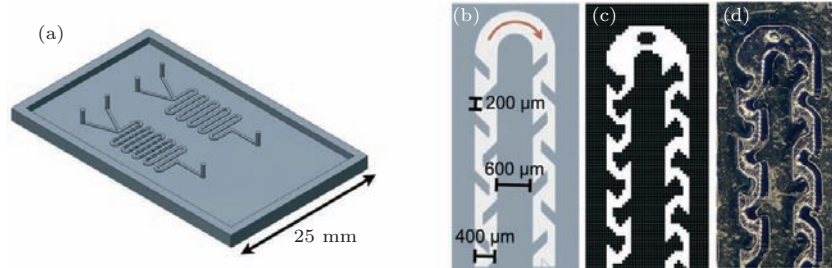


图1 (a) 用于制作混合通道的模板的3D打印效果图; (b), (c), (d) 分别是模板设计图的细节、用于打印时模板位图的细节和打印出的模板细节

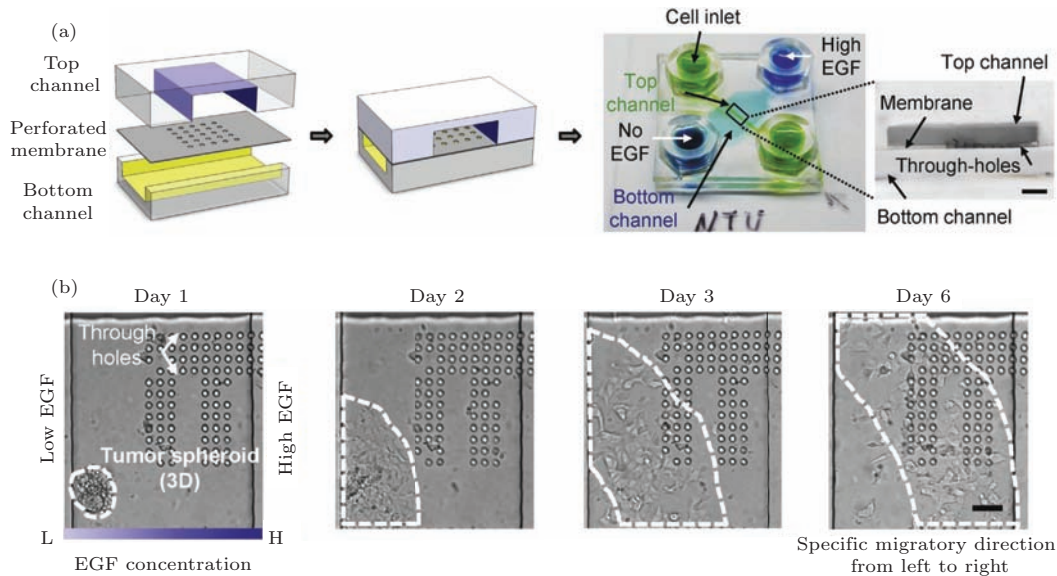


图2 (a) PDMS 芯片结构示意图和 PDMS 芯片实物图. 绿色的“井”是细胞的出入口, 蓝色的“井”被用来产生 EGF 梯度; (b) 人乳腺癌细胞 MCF-7 的细胞团在 EGF 的浓度梯度 (20 ng/(ml·mm)) 作用下沿着梯度方向扩散, 白色曲线内是细胞群所在位置

虽然现阶段研究人员已经在所建立的微结构中研究并记录了肿瘤细胞不同于在二维结构中的迁徙行为, 然而上述研究中使用的传统微结构加工技术所制作出的三维微结构多是由准三维结构(具有三维特征的二维结构)组合而成, 尚不能做到体内组织真实三维结构的重现. 本文笔者所在的研究组在这个方面做了尝试, 结合现有的快速精准的3-D打印技术和成熟的模塑法, 基于一个真实病例在体外重构出一个具有真实血管三维微结构的PDMS芯片. 研究组首先使用计算机三维辅助设计软件(computer aided design, CAD)在血管造影

图的基础上重建出血管的三维结构(如图3(a)), 之后使用3D打印机(美国3D Systems公司的Projet HD3500喷墨式3D打印机)将血管的模型打印出来(如图3(b)), 模型的材料选择的是一种特殊的蜡质(VisiJet M3 Hi-Cast). 将蜡基模型浸入PDMS中抽除气泡并固定, 放置于室温待PDMS固化, 接着使用正己烷溶液经多次超声溶解去除蜡基模型, 最后将其洗净干燥获得具有真实三维结构的PDMS芯片.(如图3(c)).

研究组使用的HD3500为当今世界上最高精度3D打印机之一, 其精度可达 16 μm. 图4(b)是

PDMS 芯片的通道内表面的扫描电镜照片, 从图中已经可以看到真实还原的血管的三维形貌, 但是管道内壁较为粗糙. 虽然打印机的加工精度为 $16\ \mu\text{m}$, 但是脱模之后得到的粗糙度却大约为 $50\ \mu\text{m}$, 对于细胞 ($10\ \mu\text{m}$ 量级) 来说这个精度还不够高. 综上所述, 研究组目前已经能够制作具有真实体内结构的 PDMS 芯片, 用来研究毫米尺度的肿瘤细胞在血流带动下的分流特点. 但是由于受制作工艺的限制, 芯片结构精度还不够高而且管道为不可侵入的 PDMS 材质, 故还不能满足未来细胞尺度的特异性研究需求, 如不同肿瘤细胞粘附血管内皮的能力和微观机理、肿瘤细胞在血流中贴附血管内壁之后穿过血管向组织内部继续侵袭的特点等. 所以该工艺还有望从结构加工精度和结构材质两个方面重点加以改进.

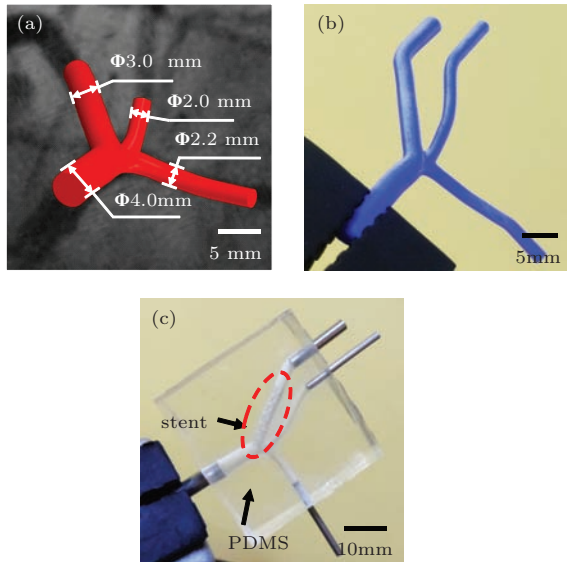


图3 (a) 计算机辅助设计软件重建出的真实病例的血管三维模型; (b) 使用3D打印机打印出的三维蜡基血管模型; (c) 使用(b)中所示的蜡基血管模型脱模制作成的具有真实三维结构的PDMS芯片

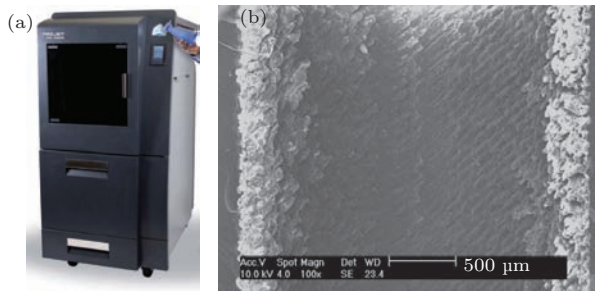


图4 (a) 3D Systems 公司的 Project HD3500 型号喷墨3D打印机; (b) 扫描电子显微镜 (SEM) 拍摄的 PDMS 芯片管道内表面, 该粗糙内表面为加工精度 ($16\ \mu\text{m}$) 和脱模工艺所造成

2.2 飞秒双光子三维激光直写技术

相较于传统的 PDMS 模塑法, 飞秒双光子三维激光直写技术在加工精度方面就有了很明显的优势. 飞秒双光子三维激光直写技术的核心是双光子聚合的化学反应. 光引发剂吸收双光子 (或与光敏剂配合吸收光子) 引发聚合物单体链式聚合反应, 实现三维微纳米结构制造. 具体来说就是固定装置物镜焦点不变通过控制样品台的移动精确地控制位移, 光敏材料被激光照射到的点吸收光子 (双光子的吸收遵循非线性光学理论, 即吸收率正比于光强的平方) 发生聚合反应逐点固化, 进而在三维空间上实现聚合形成三维结构, 从而精确控制材料的三维加工. 也正是这种逐点加工的特点使飞秒双光子激光直写技术拥有更高的打印精度 (二维特征尺度可达到 $100\ \text{nm}$, 三维特征尺度也可以小于 $150\ \text{nm}$), 为制造出更精细更具仿生性的细胞微环境结构提供了可能.

2.2.1 光刻胶生物支架

目前最常用的光敏材料为光刻胶, 它的主要成分是光敏化剂、光引发剂、有机溶剂和溶解抑制剂. 现阶段在生物物理研究中被广泛使用的光刻胶包括: SU-8, Ormocomp 等.

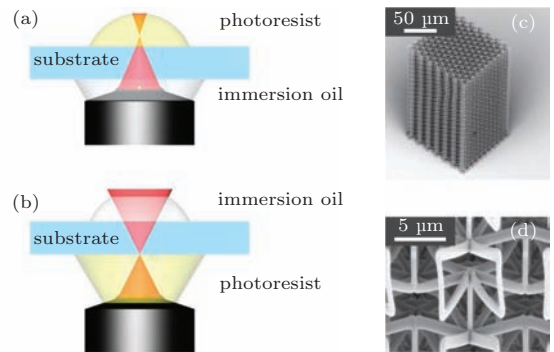


图5 (a) 传统三维激光直写技术原理图; (b) 浸入式激光直写技术原理图; (c) 利用浸入式三维激光直写技术加工出的具有六重轴的三维微结构; (d) 为(c)结构最顶层结构的放大图

Tiemo Bückmann 等人就利用光刻胶作原材料, 用浸入式三维激光直写技术制造出了可调节泊松比、具有各向异性的蝴蝶结状功能性原件^[11], 如图5, 该元件形状特别同时精度较高有望在骨组织研究领域或生物体外细胞培养中得到应用. 制造所使用的浸入式三维激光直写技术实际上是在传统三维激光直写技术的基础上做了改进, 通过将光刻

胶置于物镜与玻璃衬底之间,有效降低传统技术中与深度有关的光学畸变,从而实现在保留结构亚微米级特征尺寸的同时,还能将总体结构的打印高度提升至毫米级.这一微结构在高度尺寸上的突破也有望用于满足研究癌细胞的细胞群或整体组织的移动、侵袭及细胞间交互作用时的需求.

当三维激光直写技术实现了高精度三维结构制造这第一步,科学家们就开始寄希望于在设计制作的特定结构中培养细胞,来实现体外的细胞行为观察及病理学、药理学研究,同时也希望能够通过控制微结构运动,推进药物目标传递、体内标记、活体组织检查、细胞控制、短距离放射治疗等方向的发展^[12].因此 Franziska Klein 等人就使用生物

兼容性光刻胶 Ormocomp 作为材料,用飞秒双光子激光直写技术制造出三维结构来测量细胞的作用力^[13].如图 6 所示,该结构中的柱体高度为 15 μm ,连接横梁直径为 0.6 μm ,这也再次证明了激光直写技术具有非常高的加工精度.该研究组通过在结构上添加一层纤维连接蛋白来使心肌细胞附着在生物支架上,并记录心肌组织收缩使横梁产生的位移量,测量支架的弹性系数,最后计算出心肌细胞收缩力.由此可见,飞秒双光子激光直写技术实现的精细结构的设计制造,有助于检验细胞生长、运动相关理论,了解相关物理参量,同时也为研究癌细胞侵袭过程中细胞间相互作用打下基础.

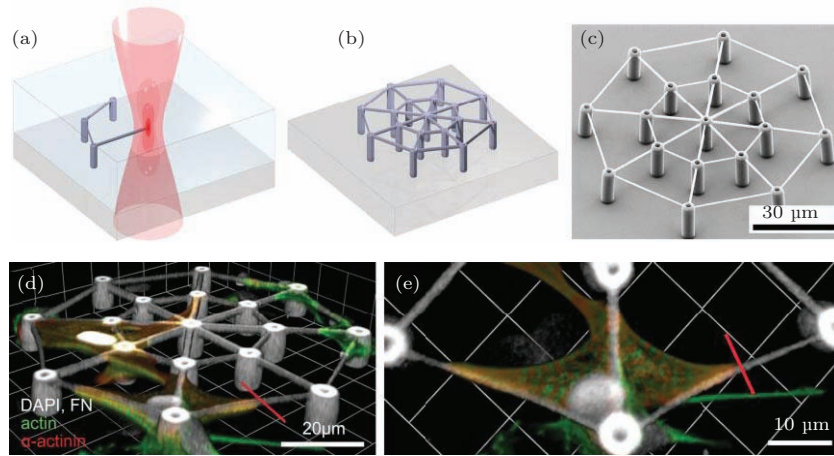


图 6 (a), (b) 飞秒双光子三维激光直写技术的加工原理图及三维生物支架的模型图; (c) 三维支架的 SEM 照片; (d), (e) 支架共聚焦显微照片的三维重构,鸡心肌细胞附着在由生物兼容性光刻胶 Ormocomp 制造的支架上,连接横梁的直径为 0.6 μm (侧视图(d)俯视图(e))

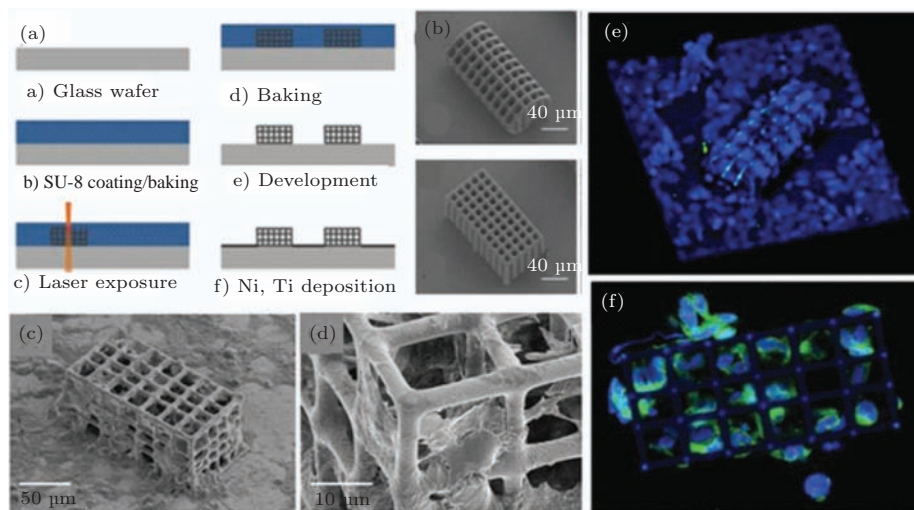


图 7 (a) 磁控微型机器人的制备过程; (b) 不同种类微型机器人的 SEM 照片,分别为圆柱体和六面体; (c) 附着细胞的六面体微型机器人的 SEM 图; (d) SEM 局部细节图可清晰显示丝状伪足; (e), (f) 共聚焦显微镜下附着荧光染色细胞的圆柱体微型机器人,六面体微型机器人

基于上述结果, Sangwon Kim 等人同样使用这种方法制造出了可以磁驱动微型机器人^[14], 以实现三维细胞培养和定向运输(如图7所示). 该研究组利用光刻胶SU-8作为材料, 通过调试扫描速率、激光能量、薄层间距离等参数值, 应用三维激光直写技术制造了具有六面体和圆柱体多孔结构的两种微型机器人. 更重要的意义在于, 该研究用蒸镀的方式在微型机器人结构表面沉积上一层镍以实现磁控制, 沉积一层钛以提升生物兼容性, 一举实现了微结构的磁驱动和人胚肾细胞(HEK293)在其上的培养. 证明了机器人使用的材料不仅对细胞没有毒性, 而且还能够实现细胞的黏着、增殖与迁移. 此项研究的成果日后很有希望用于微结构中癌细胞的培养、多细胞群体在血管中的定点控制和药物传递.

2.2.2 胶原蛋白、明胶生物支架

上述的两个研究都是采用在光刻胶制造的结构上附着了一层生物兼容性材料(如纤维连接蛋白、金属钛等)的方法来三维结构表面的生物兼容性. 但是这种方法使制造工艺变得繁琐, 且将研究范围局限在三维结构表面, 无法研究癌细胞侵入三维结构内部的过程. 而胶原蛋白以及明胶类材料不但本身具有优良的生物兼容性, 其良好的表面活性也利于细胞吸附, 有研究者把细胞、细菌等直接和胶原蛋白、明胶混合, 采用模塑法或双光子聚合

将混合后的液态材料制成三维微结构.

这里所说的模塑法是先利用PDMS等制作模板, 再将胶原蛋白注入模板中成型、组装, 并利用化学方法和物理方法使胶原蛋白发生交联反应, 进而形成三维结构. 图8为Ying Zhang 等人在胶原蛋白生物芯片中, 通过观察分析内表皮细胞的生长、内表皮细胞与血管周细胞的相互作用以及内表皮细胞与血液成分的相互作用, 研究血管再生术和血栓症^[15]. 而在癌症生物物理研究中, 癌细胞的侵袭和转移也需要探究其进入血管血液中和从血液中重新粘附血管进入组织的过程. 相信该模型会为癌细胞在血管中移动或黏附、细胞-环境交互作用对侵袭的行为影响、药物对癌细胞的行为影响等众多方面研究提供新的思路.

Connell 等人将光敏分子混入明胶、牛血清蛋白等中成功配制出能有效提升细胞存活率的优良生物兼容性光刻胶, 如图9所示, 并将不同细菌混合在光刻胶中制备出虽然具有物理间隔, 兼备化学交互作用的结构, 在体外研究了不同种细菌群落的相互作用^[16]. 可见, 相比上文提到的利用模塑法制造成的胶原蛋白矩形血管网络, 飞秒双光子激光直写技术加工的三维高精度复杂血管构造和其他组织, 显然在结构的仿生性上向前迈进了一大步, 对升级现有微流体芯片制造技术, 开拓崭新的癌症生物物理研究方向非常重要.

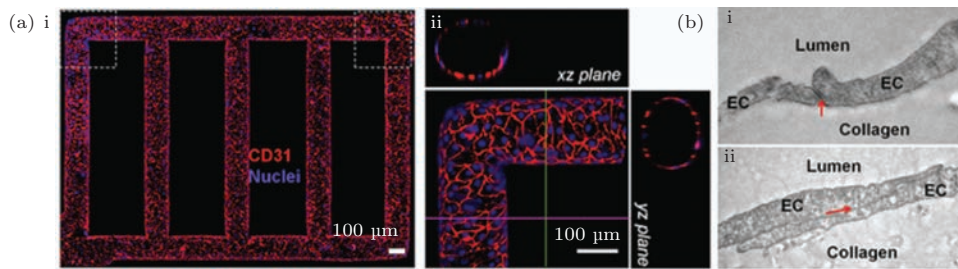


图8 (a) (i) 共聚焦显微镜下的内皮细胞微流体通道, (ii) 虚线框部位的放大图(红色为血小板内皮细胞黏附分子, 蓝色为细胞核); (b) 内皮细胞交合处的透射电子显微镜照片 (i) 点接触 (ii) 部分重叠

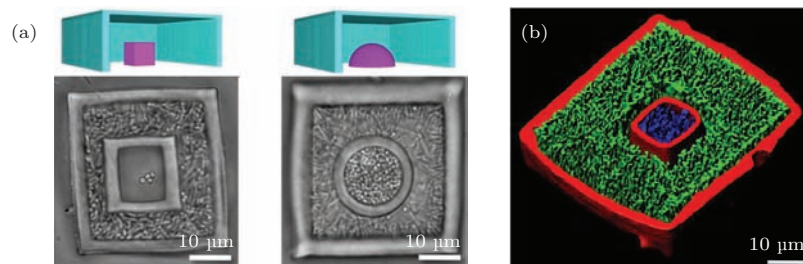


图9 (a) 三维复合结构模具的截面图(上图)以及明场下具有低密度金黄色葡萄球菌的复合结构(下图); (b) 荧光共聚焦显微镜下的复合结构截面图, 可显示金黄色葡萄球菌(蓝色部分)与绿脓杆菌(绿色部分)完全阻隔

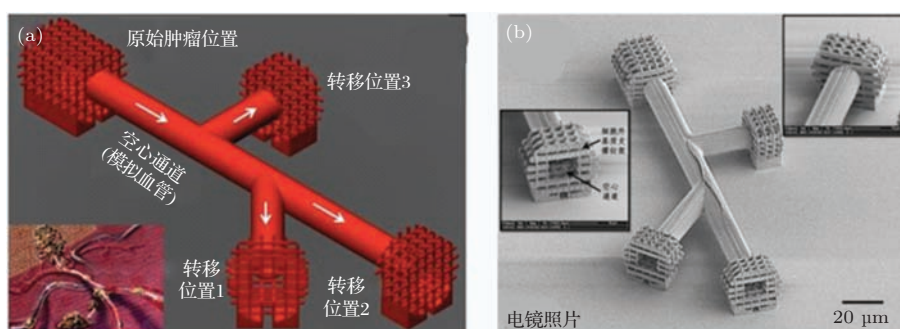


图 10 仿血管微结构 (a) 计算机辅助设计出的癌细胞转移模型支架; (b) SEM 照片显示出由飞秒激光三维直写系统加工出的由生物相容性光刻胶构成的三维模型具备很高的精度 (研究组工作)

自 2013 年初, 笔者所在研究组开始使用飞秒双光子三维激光直写系统设计 and 制备可用于细胞研究的三维微纳米生物相容性结构. 研究组通过用 CAD 设计出可直接被激光直写系统识别的三维微纳米结构, 在活体外建立肿瘤细胞的三维转移模型, 并研究细胞转移机理. 图 10 (a) 是肿瘤细胞发生多点转移的示意图, 肿瘤细胞脱离原发位置通过血管流向不同的远端组织并进行转移. 通过 CAD 的方法可以构建图示的三维结构, 其中衍架结构 (包括一处原始肿瘤位置, 三处细胞转移位置) 用于支撑和固定细胞外基质, 而其余中间空心管道用于模拟血管, 连接原始肿瘤位置及转移位置. 图 10 (b) 的 SEM 照片显示的是通过激光直写系统加工出的转移模型图像, 再一次证明了飞秒双光子三维激光直写系统具备较高加工精度, 能够用于制造非常精细的三维结构, 满足癌细胞三维体外研究精度的需求. 进一步的工作正在进行当中.

上述研究表明与模塑法相比利用光为媒介的飞秒激光三维直写技术可以将打印精度大大提高, 并且可以选择多种高分子材料及生物相容性材料作为加工基底. 但从上述多个研究中也看出使用这种制造技术制造的三维结构尺寸多局限在毫米级以内, 而单个细胞尺寸就达到 $10\ \mu\text{m}$, 如果用此方法大量建造研究癌细胞所需的三维生物结构, 那么所需要的时间将以天数计算, 而且还会对激光器造成极大的损耗.

2.3 紫外线照射固化水凝胶成型技术

为了能在确保打印精度的同时提高打印速度, 科学家们用紫外光 (ultra violet, UV) 照射固化水凝胶 (hydrogel) 的方法进行了新的尝试. 水凝胶是一种高含水量的亲水或双亲性聚合物材料, 其具有与人体软组织相似的力学性质且具有很好的生物

兼容性, 因此被广泛用于组织工程中. 传统的水凝胶固化方法是利用高分子键间的化学作用或者物理作用使分子交联成网络, 这个过程很难人为地精确调控, 因此也无法实现对水凝胶固化所形成的结构进行设计. 有一种改进的方案是用化学修饰的方法在水凝胶中透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 的高分子侧链上引入甲基丙烯酸基团, 得到可以在紫外光照射下产生交联的水凝胶, 即被紫外光照射到的部分会固化成型, 而没有被紫外光照射到的部分依然呈液态, 这样通过控制曝光就可以实现对材料外部和内部结构的精确调控.

基于以上基础所设计的紫外光照射固化水凝胶的 3D 打印平台原理如图 11, UV 光源①通过冷光镜过滤、透镜聚焦后均匀照射到数字微镜芯片 (digital micro mirror device, DMD)③上. 由计算机控制的 DMD 接收 CAD 三维结构断层切片图像数据, 偏转芯片上面的几百万个微反射镜阵列将 UV 图像点阵反射到曝光平台^[8], 精密投影镜头④把 UV 图像点阵聚焦在焦平面上, 使焦平面上的水凝胶单体薄层曝光固化^[5-7]. 电动平台⑤的位移通过计算机编程控制^[3,8,17].

其中 DMD 芯片③作为平台的核心部件, 可以精准地控制材料成型确保打印平台的打印精度, 其主要原因是 DMD 芯片能将计算机输入的 CAD 图像数据转化成高分辨率、大尺度、动态的数字掩模. 以德州仪器公司的 DLP 9500 DMD 芯片为例, 它上面载有 1920×1080 个 $10.8\ \mu\text{m} \times 10.8\ \mu\text{m}$ 大小的铝镜微阵列, 每个微镜都可通过寻址对应 0/1 开关通断独立控制偏转 $\pm 12^\circ$ 的倾斜角, 使其对应的像素点光束朝向或偏离光路, 而开关速率可高达 23 kHz, 这样其产生的高分辨率动态掩模图形就可以确保打印过程中较好的打印精度 ($\sim 1-10\ \mu\text{m}$). 另外整个过程中水凝胶薄层的厚度是通过石英玻

璃片和平台表面之间注入的水凝胶单体的体积来控制. 一般每10 s左右就可以完成一个薄层的曝光, 然后由计算机控制的电动平台自动下移一段距离, 注入新的单体, 在已经固化的结构上面继续曝光上一层. 这样通过多层叠加就可以快速重构出完整的任意三维复杂水凝胶结构, 相较于飞秒双光子三维激光直写技术逐点固化成型的加工方式, 该技术大大缩短了复杂三维微纳米结构的加工时间, 实现了省时省力的目标. 根据研究需要将细胞种植到3D打印的水凝胶支架上, 可以进行必要的细胞生物物理体外研究.

在实际研究应用中科学家们一般还会在透明质酸分子骨架引入细胞黏附肽、肝素等生物分子或是改性透明质酸的参数来调节水凝胶材料的性质, 分析不同情况下细胞的存活率和黏附性能, 调控细胞在水凝胶3D支架上的生长行为^[7,18], 以得到最优化的3D打印的材料, 实现最大限度模拟体内微

环境的目^[3].

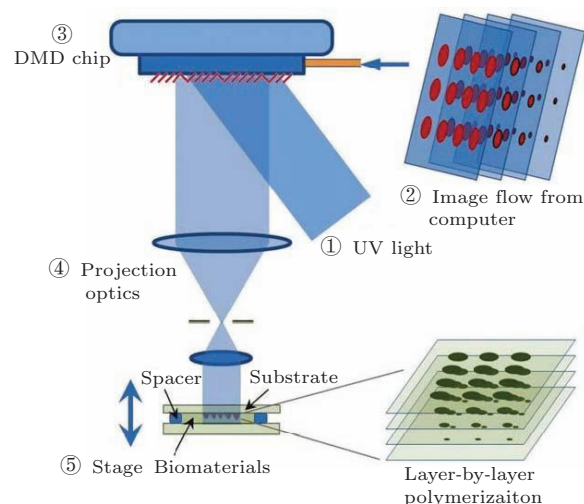


图11 紫外光照射固化水凝胶的3D打印平台的示意图, ①紫外光源, ②计算机控制部分, ③数字微反射镜器件DMD, ④投影光学系统, ⑤电动移动平台; 计算机协调控制③数字微镜阵列, 持续注射水凝胶, ⑤电动移动平台下移, 一层一层叠加打印出整个3D结构

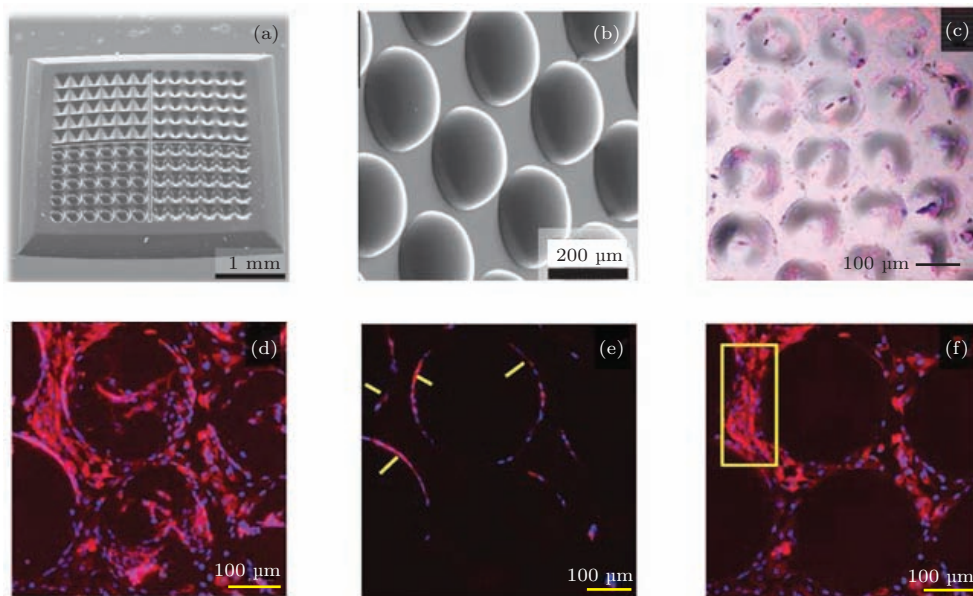


图12 (a) 多种三维微结构组成的结构芯片的扫描电镜照片, 结构的材料是100%的聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA); (b) 半球式结构的电镜照片; (c) 共聚焦显微镜下结构俯视图, 显示出HUVEC在含有15%GelMA的结构上培养四天后的生长梯度; (d) 更高放大倍率的俯视图, 显示出半球结构上HUVEC的多细胞组织; (e) 半球式结构底部的圆周沿Z方向的截面图, 黄色箭头所指的是细胞群在支架上表现出的索状形态; (f) 半球式结构底部沿Z方向的截面图, 显示出在半球结构间隙细胞群表现出的形态

Zhang 等人就利用这种UV照射固化水凝胶的技术设计打印出一系列特定的三维微纳米结构^[8]. 图12(a)是一种半球式结构的扫描电镜照片, 可以看出其结构非常规则且表面十分光滑. 证明了这种打印技术加工精度较高而且比较适合用于加工较软的生物材料, 因此可以用作加工复杂的细胞外间质结构. 之后他们又在这种半球式结构(材料含

有15%的甲基丙烯酸明胶GelMA)上种植脐静脉内皮细胞(HUVEC), 培养4天后用共聚焦显微镜观察, 如图12(a)—(d)可以看出在接近结构底部平面上(类似于二维培养皿)的细胞群和半球球面上的细胞群表现出不同的形态特征, 细胞仿佛能识别这种几何架构. 日后的研究或许可以通过设计三维支架, 也就是给细胞不同的几何线索, 来操纵

HUVEC 细胞群组成不同的组织形态. 这种细胞与环境交互作用的研究也为探究癌细胞侵袭过程中与环境交互作用的机理提供了很好的思路.

除此之外, Huang 等人也利用这种技术打印出如图 13 的蜂窝状结构^[18]. 通过设计三种不同的结构宽度, 种入具有转移性的宫颈癌细胞 (Hala) 或没有转移性的胚胎间充质干细胞 (10T1/2), 研究两种细胞在不同宽度的三维结构中的生长情况

和移动速率. 其研究数据显示三维结构的宽度对 Hala 有影响, 随结构宽度的增加 Hala 的体积减小迁移速率也减小, 但是 10T1/2 的生长和移动却没有明显地受到结构宽度的影响. 这个结论也解释了 10T1/2 迁移过程中对几何线索相对不敏感的特性. 也就是说癌变细胞对几何线索比非癌变细胞更敏感, 这种差异的背后机制很可能是潜在的癌症治疗策略.

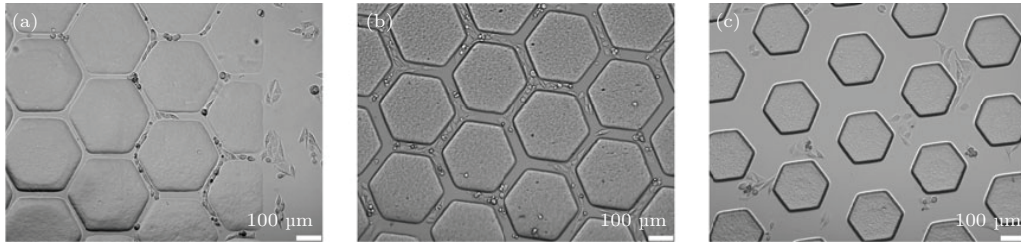


图 13 光学显微镜下 Hala 细胞在宽度不同的三维结构 (材料为 PEGDA) 中的图像 (a) 25 μm 宽的结构; (b) 45 μm 的结构; (c) 120 μm 的结构

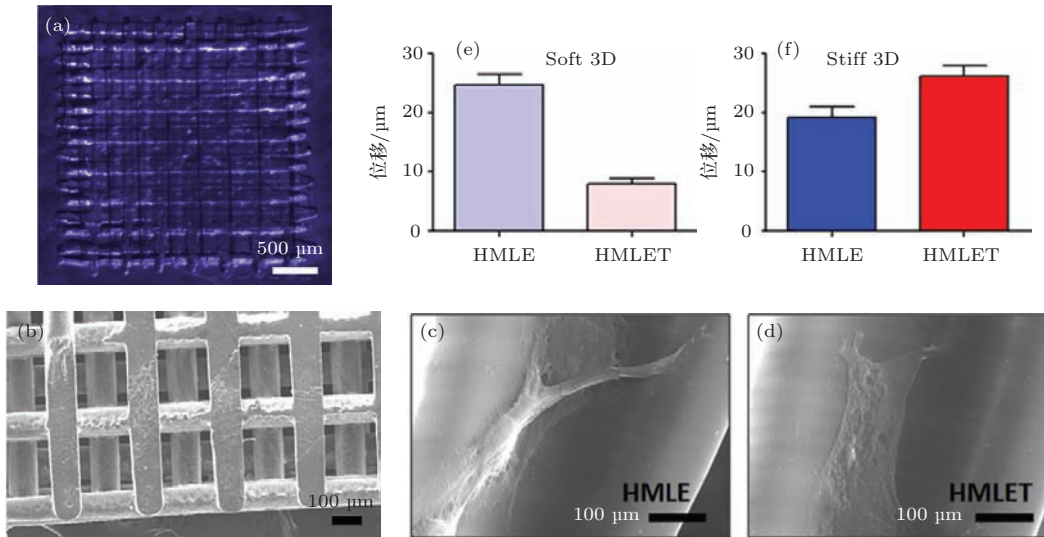


图 14 (a) 用 DMD-PP 方法打印出 3D 条状层叠结构 (材料是 PEGDA) 俯视图, 几乎是光学透明的, 三维层叠结构共五层, 高度为 0.5 mm, 每一层厚度为 0.1 mm; (b) 扫描隧道显微镜下的结构俯视图; (c), (d) HMLE 和 HMLET 在三维立体条状层叠结构上迁移的 SEM 图; (e), (f) 实验数据直方图

在 UV 数字投影 (DMD-PP) 固化水凝胶的核心技术的支持下, Pranav Soman 等人得到如图 14 的条状层叠结构, 用来研究细胞在不同软硬程度 (弹性系数不同) 的三维结构上的迁移表现^[4]. 大多数实体瘤或是体内结构都表现出柔软和弹性, 癌细胞在面对软硬不同的三维微环境所表现出来的侵袭特性也很有可能是不同的. 因此他们用分别用含 19% 和 95% 的 PEGDA 材料打印出软硬程度不同的两类三维支架, 其中较硬三维支架的压缩模量 (~ 5.5 MPa) 约是较软支架 (~ 0.9 MPa) 的

6 倍左右. 人正常乳腺癌细胞 (HMLE) 与转移性乳腺癌细胞 (HMLET) 被种植在这些结构上, 经过相同的时间观察其生长特性如图 14 (c), (d) 他们的实验数据证实了在面对较软的结构时转移性癌细胞和非转移性癌细胞的迁移表现出比较明显的差异性, 而在面对较硬的结构时这种差异则不明显. 如图 14 (e), (f) 这样的实验结果肯定了我们在体外还原体内复杂微环境的必要性, 也就是说用传统坚硬的结构来研究癌细胞的迁移行为是存在缺陷的. 所以进一步的研究就需要探究能高度还原癌细胞生

长微环境材料的参数。

Linetal 则用这种技术做出如下一种实心结构和一种多孔的结构。脂肪干细胞被封装在结构内部, 结构的主要材料是聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 和锂苯基-2, 4, 6-三甲基苯甲酰基膦酸酯, 培养几天后用力学测试与模拟 MTS (mechanical testing & simulation) 实验分析不同孔隙率结构中的细胞活性^[19], 如图 15 (b)。可以看出, 24 h 以内两种结构中的细胞活性基本相同, 但在第三天和第七天两种结构上的细胞活性表现出明显差异 (第三天 $p < 0.01(**)$, 第七天 $p < 0.05(*)$), 细胞在带有孔隙的三维结构中比在实心的三维结构中有更高的生物活性。带有孔隙的结构能提供给细胞生存代谢更多的氧气, 他们的工作再一次证明了细胞

在面对结构特性不同的三维结构时所做出的反应是不同的。

由此可见, 紫外光照射固化水凝胶的方法已经能打印出一系列的体外三维微结构用于细胞生物物理的研究, 并且取得了一些阶段性成果。这种方法相较于模塑法和激光直写技术具有两个明显的优点: 一是它的材料本身有着良好的生物兼容性, 无论是在力学性能或是化学通透性方面都能够较好的模拟体内环境, 更适合还原细胞生长的外在条件; 二是它可以在实现较高精度 ($\sim 1-10 \mu\text{m}$) 的同时在短的时间内打印出一些较大的器件, 所以用这种方法来建造研究癌细胞相关性质和侵袭机理所需尺度的三维生物结构比较合适。

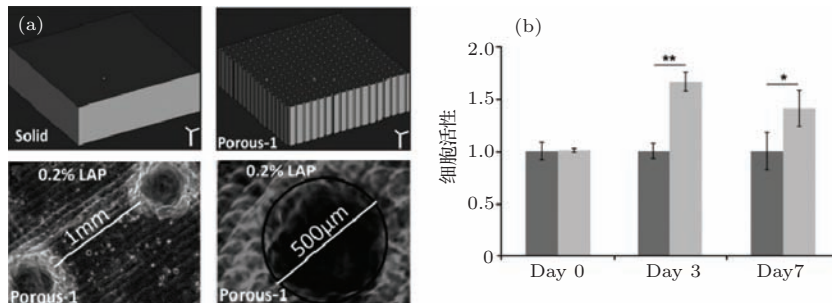


图 15 (a) DMD-PP 方法打印出的实心结构 (Solid) 和多孔 (Porous-1) 的结构; (b) 分别在实体结构和多孔结构中使用 MTS 实验检测细胞活性, 根据统计学显著性检验方法得到的 p 值

3 三维微生态仿真系统的展望

虽然癌细胞生物物理研究已经取得了很多突破性进展, 发现侵袭同细胞与细胞间相互作用, 细胞收缩性以及细胞与基底的粘附等因素密切相关, 并且对癌细胞侵袭的方式有了较完整的总结。但是如何真实地模拟癌细胞体内生长环境进一步研究癌细胞侵袭背后的机理仍然是一个难题。为了解决这个难题, 国内外研究人员结合当今最前沿的 3D 打印、3D 微加工的技术和理念, 利用 PDMS 模塑法、胶原蛋白/明胶成形、三维激光直写、紫外照射固化水凝胶等方法已经构建了各具特点的三维微结构。然而由于细胞及组织器官的复杂性, 以及其对加工精度和加工尺度的特殊要求, 现今的三维微纳米制造技术虽然进行了一系列的尝试在某些方面进行改进但仍不能完全实现对细胞微环境的真实重现, 而且对于建立的三维微环境的全面观测和对其的精确操作依然是空白。

所以根据多年研究经验和深刻思考, 笔者研

究组计划建立一套创新性的三维微生态仿真系统 (3D micro-ecology simulation system, 3D MESS 系统)。该系统将以发展紫外光照射固化水凝胶打印平台为核心, 集成光片成像系统 (light sheet imaging), 三轴微纳米吸管 (micro/nano pipette), 活细胞培养装置等一系列自主创新模块, 目的在于利用 3D 打印的理念加工出具有微米级别精度的复杂三维微结构, 在此基础上实现对细胞分布的精确控制。该技术将打破当前生物医学研究的技术瓶颈, 为现今生物医学实验手段和系统带来革命性的改变。

图 16 所示的是 3D MESS 系统的所使用的四个主要技术: 生物兼容性紫外固化水凝胶的制备及注入、数字微反射镜投射式 3D 打印、光片照明成像、三轴微纳米吸管控制、可实时监控式活细胞培养。

配制适用于 3D MESS 系统使用的紫外固化水凝胶是最基础也是最关键的技术之一, 如果 3D 打

印所使用的高分子材料当中有有毒性的游离单体或者降解物,将会影响到细胞生存率甚至细胞的生长特性,这将使细胞体外生长的研究无从开展.同时传统用于3D打印的高分子材料,无法模拟体内微环境的力学性能和化学通透性. 研究组将自行合

成在紫外光源下能够精确成形、透明且具有良好的生物兼容性的水凝胶. 并使用微机械泵编程控制的光敏水凝胶单体注入系统将这种高透明、高生物兼容水凝胶材料注入,使其经UV固化后形成设计的三维微结构.

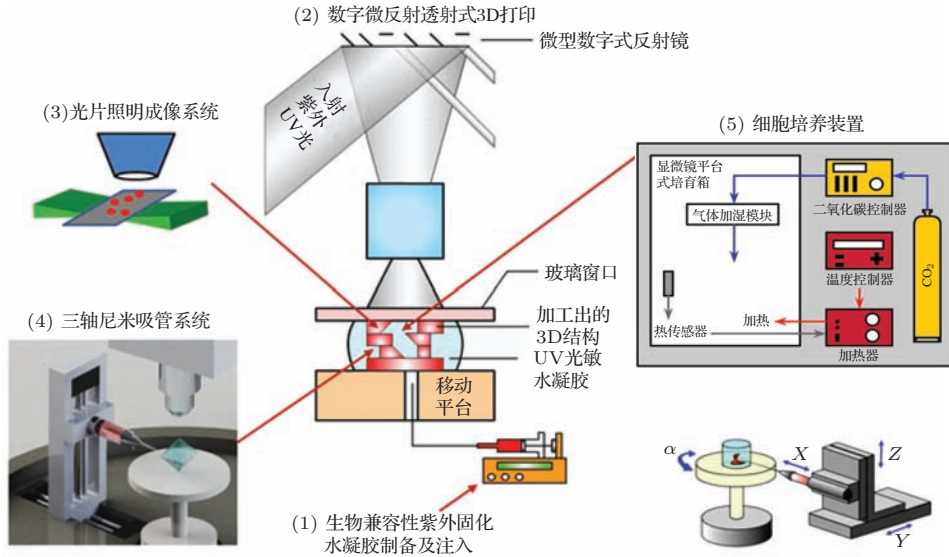


图 16 活细胞生物结构 3D 紫外打印成像实验系统的简略结构图及组成部分

多方位光片照明成像系统的原理是激光经过片层光学元件变成小于 $10\ \mu\text{m}$ 的薄片状光束照射样品,至少同时从左右两个方向照射样品(减少样品内部结构本身的吸收或散射造成样品内部的照射不均匀性). 探测光路与照射薄层平面互相垂直,得到断层截面的图像,通过 Z 方向扫描,重构出三维图像. 该光片成像系统可以对厚度达毫米级别的样品成像,能大大扩大研究范围,最后实现高速、大视野、高景深的整体组织 3D 成像.

架设在微操纵三轴定位装置上的微纳米吸管可以实现纳米管径针头的精确定位,结合数控微泵可以在三维微结构中指定位置精确放置特定数目的细胞,甚至还可以寻找芯片中特定的细胞并且将其样本吸出做分子分析(图 17 即为一个正在往侧面穿透三维水凝胶结构并吸取细胞内含物做活检的纳米吸管). 由于微纳米针尖可选管径仅为 $40\ \text{nm}$ 到 $1\ \mu\text{m}$ 左右,所以在插入芯片水凝胶结构时仅造成微洞,在水凝胶表面张力的作用下,该微洞会在微纳米探针拔出后迅速愈合,不会造成显著的微结构改变. 因此微纳米吸管技术可以随时插入芯片的指定位置,对细胞操作后再取出而不对系统造成任何影响,实现微生态系统的并行运行和抽样

分析的随时进行. 而现有的技术仅将活细胞和胶原蛋白或者水凝胶混合一起,注入结构较为简单的三维结构中培养以观察其生物特性,并不能做到细胞初始生长位置的精确定位. 活细胞培养装置可实现活细胞在显微镜载物台上的培养,从而可以在显微镜底下实时观察细胞生长状态.

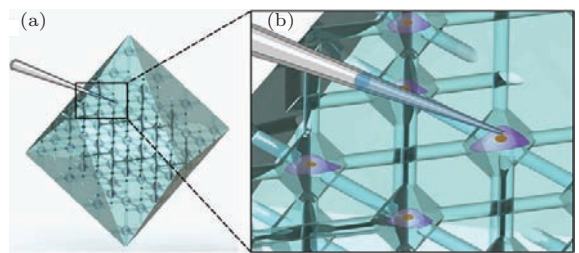


图 17 (a) 三轴纳米吸管插入 3D MESS 打印出的三维水凝胶微结构内部(概念图); (b) 放大图显示微米吸管可以穿透芯片水凝胶结构,对当中细胞进行精确排布及其他操作

3D MESS 系统的建立将促进新型生物兼容性材料的研制,新型 3D 生物材料打印平台的建立,通过光学成像技术对三维结构及其中的活体细胞等进行观测和研究,还会促进使用三轴微纳米吸管装置对实验目标和结构进行紧密调控的原创技术的

开发. 3D MESS将为在三维微结构中的肿瘤转移模型及分子研究带来新的局面, 在将来, 生物学家和医学工作者可以利用该系统任意设计和打印3D细胞培养结构, 模拟体内环境进行相关实验, 实现打印、培养、实验、观测、记录分析的操作一体化.

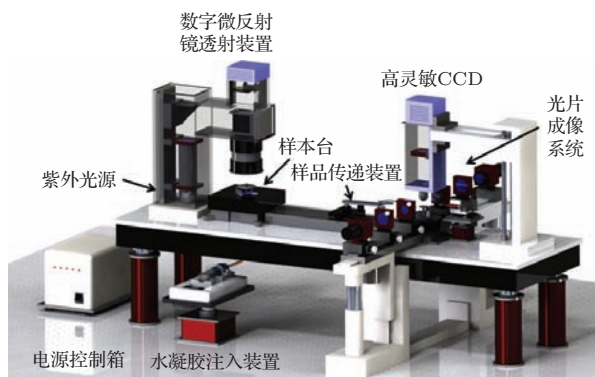


图 18 3D MESS 系统效果图

4 结 论

虽然癌细胞生物物理在体外三维微纳米结构中的研究才刚刚起步, 但是已经展露出了巨大的研究价值和应用潜力. 本文系统回顾了现有在生物领域广泛应用的多种三维微纳米结构加工技术, 如PDMS模塑、胶原蛋白/明胶成形、三维激光直写、紫外照射固化水凝胶等. 在此基础上, 介绍了笔者所在研究组设计的3D MESS系统, 该系统不仅能加工出三维微纳米结构, 同时还有望实现打印、培养、实验、观测、记录分析的一体化. 希望该系统的成功搭建能帮助科学家们更深入地研究癌细胞的转移机制理解癌症的致命机理, 最终为探索新的癌

症治疗手段做出贡献.

参考文献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun M J 2009 *Ca-Cancer J. Clin.* **59** 225
- [2] Wolgemuth C W 2011 *Physics* **4**
- [3] Tay C Y, Irvine S A, Boey F Y C, Tan L P, Venkatraman S 2011 *Small* **7** 1361
- [4] Pranav Soman, Jonathan Kelber A, Jin Woo Lee 2012 *Biomaterials* **33** 7064
- [5] Lu Y, Mapili G, Suhali G, Chen S, Roy K, J. A 2006 *Biomed. Mater. Res.* **77A** 396
- [6] Wang S, Foo C W P, Warriar A, Poo M M, Heilshorn S C, Zhang X 2009 *Biomed. Microdevices.* **11** 1127
- [7] Hoffman-Kim D, Mitchel J A, Bellamkonda R V 2010 *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **12** 203
- [8] Zhang A P, Qu X, Soman P 2012 *Adv. Mater.* **24** 4266
- [9] Germán Comina, Anke Suskaa, Daniel Filippini 2014 *Lab. Chip* **14** 424
- [10] Kuo C T, Kuo C T, Chiang C L, Chang C H, Liu H K, Huang G S, Ruby Yun-Ju Huang, Leec H, Huang C S, Wo A M 2014 *Biomaterials* **35** 1562
- [11] Tiemo Bückmann, Nicolas Stenger 2012 *Advanced Materials* **24** 2710
- [12] Nelson B J, Kaliakatsos I K, Abbott J J, Annu 2010 *Rev. Biomed. Eng.* **12** 55
- [13] Klein F, Striebel T, Fischer J, Jiang Z, Franz C M, Freymann G, Wegener M, Bastmeyer M 2010 *Adv. Mater.* **22** 868
- [14] Sangwon Kim, Famin Qiu 2013 *Adv. Mater.* **25** 5863
- [15] Ying Zhang, Junmei Chen 2012 *PNAS* **109** 24
- [16] Connell J L, Ritschdorff E T 2013 *PNAS* **110** 46
- [17] Anselme K, Bigerelle M 2011 *Int. Mater. Rev.* **56** 243
- [18] Tina Qing Huang, Qu X, Justin Liu, Shaochen Chen 2014 *Biomed Microdevices* **16** 127
- [19] Kolin Hribar C, Pranav Soman, John Warner 2014 *Lab. Chip* **14** 268

SPECIAL ISSUE — Cancer biophysics

3D micro/nano fabrication and its application in cancer biophysics*

Lu Jin-Lei Wang Xiao-Chen Rong Xiao-Hui Liu Li-Yu[†]

(Laboratory of Soft matter, Institute of Physics Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

(Received 18 November 2014; revised manuscript received 16 December 2014)

Abstract

The major reason why cancer kills is its metastatic potentials. Metastasis is an extremely complex three-dimensional (3D) process. Currently, routine *in vivo* cancer research still experiences bottlenecks in observation and manipulation, while *in vitro* research mainly stays in petri-dish levels that limit cell environment with two-dimensional confinements. Therefore, it is in urgent needs to construct 3D *in vitro* models to deepen the studies in cancer invasion and metastasis. However “how to carry out” is a big question that harasses scientists for decades. In this report, we will systematically discuss several popular technologies for 3D microfabrication and their applications in bio and cancer research. Besides, we will demonstrate our efforts to construct an all-in-one 3D micro ecology simulation system (3D MESS) which highly integrates a UV bio-compatible hydrogel printer, a light-sheet imaging system, and a nano pipette operation system. This novel system will create a brand-new method to fabricate, observe and controls the 3D structures and the cells inside. We believe that these advanced technology and ambitions will definitely update the current cancer research methods and bring promising hopes for future deeper understandings and more efficient treatment of cancer.

Keywords: three-dimensional micro/nano fabrication, cancer, cancer biophysics, *in vivo* microenvironment

PACS: 87.19.xj, 87.80.-y, 87.85.J-, 87.18.Gh

DOI: 10.7498/aps.64.058705

* Project supported by the State Key Development Program for Basic Research of China (Grant No. 2013CB837200), and the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 11474345).

† Corresponding author. E-mail: liu@iphy.ac.cn