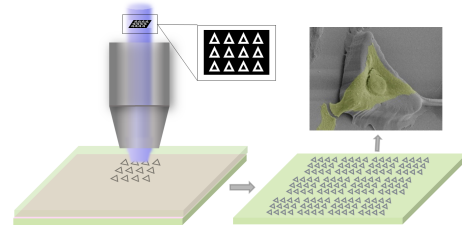


DOI: 10.12086/oe.2022.210336

高精细水凝胶微图案的快速制备及其对细胞行为的诱导

张维彩^{1,2}, 郑美玲^{1*}, 董贤子¹, 刘洁¹, 金峰¹¹中国科学院理化技术研究所仿生智能界面科学中心有机纳米光子学实验室, 北京 100190;²中国科学院大学未来技术学院, 北京 101407

摘要: 为探索不同尺寸的水凝胶微图案对细胞的诱导调控作用, 本文采用飞秒激光无掩模投影光刻技术, 将水凝胶前驱体溶液制备成所设计的图案, 同时结合大面积拼接, 获得了具有大面积、不同尺寸的多边形和多角星微结构。详细研究了微结构的最佳加工条件及其浸润性。带有微结构的基底与成纤维细胞共培养的实验结果表明, 微结构的空间限位作用会改变细胞形貌, 从而能够对细胞的生长行为进行有效地调控。尤其在小尺寸的多边形和多角星微结构上, 细胞核会落入微结构的中心陷窝, 细胞骨架则不断铺展分布, 并逐渐与微结构形貌趋于一致。该研究证实了微结构图案单元尺寸对诱导细胞行为功能至关重要, 将为利用生物相容性水凝胶微结构进行体外细胞研究提供新技术与新方法。

关键词: 无掩模投影光刻; 水凝胶; 微图案; 细胞行为

中图分类号: TH741.5; TN249

文献标志码: A

张维彩, 郑美玲, 董贤子, 等. 高精细水凝胶微图案的快速制备及其对细胞行为的诱导 [J]. 光电工程, 2022, 49(2): 210336

Zhang W C, Zheng M L, Dong X Z, et al. Rapid preparation of high-precision hydrogel micropatterns and its induction of cell behavior[J]. *Opto-Electron Eng*, 2022, 49(2): 210336

Rapid preparation of high-precision hydrogel micropatterns and its induction of cell behavior

Zhang Weicai^{1,2}, Zheng Meiling^{1*}, Dong Xianzi¹, Liu Jie¹, Jin Feng¹¹Laboratory of Organic NanoPhotonics and CAS Key Laboratory of Bio-Inspired Materials and Interfacial Science, Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China;²School of Future Technology, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101407, China

Abstract: In order to investigate the regulation effect of hydrogel micropatterns of different sizes on cell behaviors, large-area polygons and polygonal microstructures of different sizes were achieved by a femtosecond laser maskless optical projection lithography technique, in combination with a large-area splicing method. The optimum processing conditions and the wettability of the microstructure are studied in detail. The coculture experimental results of fibroblasts with patterned substrates showed that the spatial confinement in the microstructure can change the cell morphology and effectively regulate the cell growth behaviors. In particular, in the small polygonal and polygonal star microstructure, the nucleus tends to fall into the concave lacunae of the microstructure, and the

收稿日期: 2021-10-21; 收到修改稿日期: 2022-01-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (61975213, 61475164, 51901234); 中奥国际合作项目 (GJHZ1720); 中国科学院国际伙伴计划 (GJHZ2021130)

通信作者: 郑美玲, zhengmeiling@mail.ipc.ac.cn。

版权所有©2022 中国科学院光电技术研究所

spreading of cytoskeleton gradually tends to be consistent with the morphology of microstructures. This study indicates that the size of microstructural pattern units is very important for inducing cell behavior and function, which would provide a new technology and new method for cell research in vitro by using biocompatible hydrogel microstructures.

Keywords: maskless optical projection lithography; hydrogel; micropattern; cell behavior

1 引言

组织工程旨在进行组织和器官的损伤修复和重新构建, 需要成熟的细胞学理论和良好的生物材料的支撑。细胞在体内进行规则有序地排列, 呈现特殊的形貌并产生特定功能, 是各种生物化学信号、环境的地形特征和力学性能等共同作用的结果^[1]。因此, 通过功能化生物材料在体外创造一个仿生细胞微环境, 对研究细胞与环境、细胞与细胞的交互作用以及诱导调控细胞粘附、增殖、迁移和分化等生物行为具有重要意义^[2-3]。研究表明, 图案化表面对细胞具有接触诱导效应^[4], 微米结构可有效调控细胞的黏附形态与排列。2021年, Agnes Szabo 等利用 SU-8 图案化基底培养胶质细胞, 发现微沟槽阵列能够引导细胞核生长的方向, 与微柱阵列相比, 细胞核表现出更明显的拉伸长度^[5]。而纳米结构则从分子水平影响细胞的行为和功能^[6-9]。2012年, Robinson 等利用垂直纳米线电极阵列作为神经回路的细胞内接口的可扩展平台, 刺激并记录了大鼠皮质神经元的分离培养物中的神经元活动, 并证明该平台可用于绘制多个单独的突触连接^[10]。2021年, Cheng 等制备了纳米孔和纳米棒, 发现这些纳米形貌可以促进丝状体的产生和长突起的延伸, 随着孔深和柱高的增加, 细胞迁移速度和迁移方向产生相反的效果, 这可被用于细胞分拣和筛选^[11]。因此, 利用生物友好性材料创建具有不同尺度、不同拓扑地形的体外细胞培养平台, 考察细胞-材料, 细胞-环境相互作用机制, 对组织工程领域的发展具有重要意义。

水凝胶材料由于成分类似于细胞外基质, 具有良好的生物相容性、无毒性和可降解性等优点, 是组织工程、医用伤口敷料、药物输送等领域常用的生物功能材料^[12-15]。利用水凝胶材料制备不同尺寸和拓扑形貌的微纳米结构, 可以更好地模拟和维持细胞在体内的生长环境, 是当前的研究热点^[16-18]。近年来, 随着微纳加工技术的发展, 研究人员利用 3D 打印^[19-20]、软印刷^[21-22]、自组装、紫外光刻^[23-24]、激光光刻以及多种技术结合制备了各种图案化表面如沟槽-脊^[25-27],

微纳米点、棒、坑^[28-29], 网格^[30-31] 以及其它形貌的微岛^[32], 并证明了沟槽结构可以使细胞沿着沟槽取向和排列, 促进血管生成和创口愈合^[33]。点、棒、坑可以调节细胞骨架上长突起的产生和延伸, 改变细胞迁移速度^[34]。这些微结构对细胞增殖、迁移和分化等行为表现出诱导和调控作用, 对了解生物体的内在运行规律和生命的本质有着重要意义。然而, 体内细胞生活在具有复杂网络的细胞外基质中, 上述技术加工的微结构由于水凝胶性质和制造方法本身的限制, 一般都尺寸较大, 结构精细度相对较低; 同时, 又存在图案过于简单、加工不灵活等缺点。因此, 复杂程度更高、面积更大、具有任意拓扑形貌的水凝胶微结构的制备是一大难点。

基于数字微镜器件 (digital micromirror device, DMD) 的无掩模光刻技术作为传统光刻技术衍生出的一种技术, 以可单独寻址的微反射镜组成的阵列器件与对应存储元件集成的芯片作为数字掩模, 曝光投影过程同传统光刻相似^[35], 但制备的结构精度不高。本研究团队在前期所发展的飞秒激光无掩模投影光刻技术中取得了重要突破, 该技术以飞秒激光作为光源, 利用大数值孔径物镜聚焦, 通过多子场拼接可以实现大面积微结构的制备, 兼顾了加工效率和结构精度^[36-37]。

在这项工作中, 我们利用自主搭建的 DMD 无掩模投影光刻系统, 以 400 nm 飞秒激光作为面投影曝光光源, 结合多子场拼接, 制备了大面积、不同尺寸的空心水凝胶多边形和多角星微结构, 用以研究复杂地形特征对细胞生长的影响规律。实验中, 本实验室自主配制的生物相容性水凝胶前驱体可以直接利用该技术进行图案化曝光。曝光图形由计算机控制, 预先设计好尺寸和形貌, 制造过程简单、快速。带有微结构的基底与成纤维细胞 L929 共培养实验证明, 空腔尺寸大的微结构由于细胞活动空间大, 细胞行为基本同二维平面上一致, 仅靠近微结构边缘的细胞的骨架会产生形变和交互。而空腔尺寸小的微结构则对细胞具有明显的限位作用, 细胞两端拉长度明显降低, 同

时方度增加。特别的是, 我们观察到小尺寸三角形和三角星微结构上的细胞骨架表现出适应基底图案的分布, 细胞核落入中心凹陷里, 细胞形貌最终铺满整个微结构表面, 形貌保持同微结构一致。该研究为制备水凝胶基底拓扑结构研究细胞行为提供了新思路, 在组织工程领域具有广阔的应用前景。

2 理论推导

2.1 实验试剂及仪器

本实验中所用的试剂包括: 聚合单体 PEGDA (Mn=700)、光敏引发剂 2-苄基-2-二甲基氨基-1-(4-吗啉苯基)丁酮和苯偶酰 (Sigma Aldrich Reagent Company, 美国); 交联剂 PE-3A (LOT. No. 0072994, KYOEISHA, 日本); DMEM 培养基 (GE Healthcare Life Sciences, 美国); 青霉素-链霉素和 DAPI 探针 (北京阳光生物科技有限公司生产); 胎牛血清 (TransGen Biotech, 澳大利亚); 肌动蛋白探针 ActinRed 555 (ThermoFisher, 美国); NaCl、KCl、 KH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 (Amresco 公司, 美国); 无水乙醇 (国药集团化学试剂有限公司); 超纯水来自 Millipore Milli-Q 超纯水机 (MQ 水电阻率 > 18 M Ω ·cm, 法国)。实验中所有试剂均未经纯化直接使用。

本实验中所用仪器: 飞秒激光器 (Spectra-Physics, MAI TAIHPINSPIRE AUTO 100); DMD 芯片 (0.7'' XGA 型, 德州仪器公司, 美国); 无掩模光刻系统 (本课题组自主搭建); 细胞培养箱 (MCO175, SANYO, 日本); 离子溅射仪 (株式会社日立制作所, 日本); 扫描电子显微镜 (SEM, HITACHI S-4800, 株式会社日立制作所, 日本); 激光扫描共聚焦显微镜 (LSCM, Nikon, AIR MP, 日本)。

2.2 无掩模投影光刻 (DMD) 制备大面积微图案

在本研究中, 所采用的 DMD 面投影光刻系统以 400 nm 的超快激光 (MaiTai HP+ Inspire AUTO100, Newport) 作为光源, DMD 芯片可以根据设计的黑白

图形生成相应的图案化光场, 白色部分反射激光, 黑色部分激光无法反射。当采用负性光刻胶曝光时, 光刻胶在激光照射下发生聚合反应, 聚合部分形成微结构; 当采用正性光刻胶时, 正性光刻胶遇光分解, 未分解部分形成微结构。通过计算机可以根据需要调控 DMD 生成的任意图案化光场。此外, 在 DMD 投影光刻中, 单次的曝光只能获得一个子场面积的微结构。通过三维位移台 (XMS160, GTS30V, NEWPORT) 精确地控制样品的移动, 可以在下一个确定位置处简单地重复上述投影光刻过程。这种拼接的加工方法, 可以在保持精度、均匀性的同时实现多种图案化微结构的批量制备。图 1 是无掩模投影光刻制备大面积水凝胶微图案的流程图。

2.3 水凝胶基光刻胶的配制及聚合流程

实验中, 聚乙二醇二丙烯酸酯 (PEGDA) 和交联剂 (PE-3A) 重量比为 2:3, 以确保结构具有足够的力学性能支撑细胞的生长。2-苄基-2-二甲基氨基-1-(4-吗啉苯基)丁酮和苯偶酰按照 1:1 混合作光引发剂。整个水凝胶前驱体中 PEGDA、PE-3A 和两种光引发剂重量比为 39.2:59.2:0.8:0.8 wt%。图 2 是光刻胶各组分化学结构示意图。投影曝光前, 取两滴水凝胶基光刻胶滴在玻璃片上, 盖上另一块玻璃片, 光刻胶受毛细作用铺满整个玻璃片间隙, 间隙厚度最高可达几十微米。曝光时, 只有白色图案部分反射激光, 被激光照射过的区域水凝胶发生聚合, 从而获得设计的微结构。曝光结束后, 从一角开始慢慢揭开玻璃片, 选用乙醇作显影液, 将玻璃片浸在乙醇溶液里 5 min, 未聚合的水凝胶基光刻胶溶解在乙醇中, 聚合的部分则留在玻璃片上, 得到所需微结构图案。

2.4 细胞-微图案共培养

培养前处理: 带微结构盖玻片裁切成合适大小, 用 70% 的乙醇溶液冲洗 3 次, PBS 缓冲液冲洗 3 次, 紫外线照射 30 min。最后, 再利用培养基清洗三次,

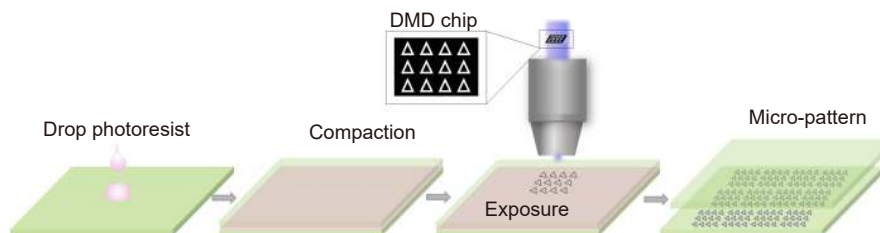


图 1 制备大面积水凝胶微图案的流程图

Fig. 1 Schematic diagram for the preparation process of large-area hydrogel micropatterns

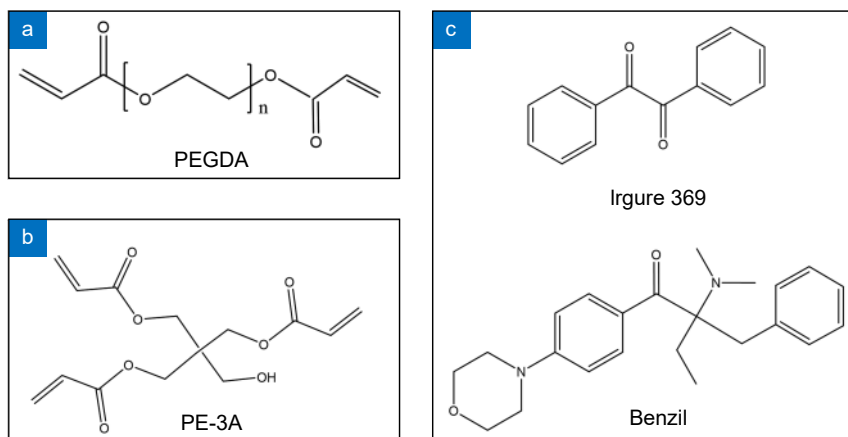


图 2 光刻胶各组分化学结构示意图。

(a) 单体; (b) 交联剂; (c) 两种光敏引发剂

Fig. 2 Schematic diagram of the chemical structures of the component of photoresist.

(a) Monomer; (b) Crosslinker; (c) Photoinitiators

干燥后放置在玻璃培养皿里。

细胞培养：细胞培养时，将成纤维细胞 L929 细胞（密度大约为 5×10^5 细胞/cm²）接种在放有带微图案盖玻片的培养皿（35 mm × 12 mm 型；NEST）中，在 37 °C、5% CO₂ 气氛的加湿培养箱中培养 48 h。

观察前处理：去除培养基，PBS 缓冲液冲洗 3 次，用 4% 的多聚甲醛覆盖培养皿，固定 15 min；0.1% 的 Triton X-100 通透 5 min；ActinRed 555 室温避光孵育 30 min，进行肌动蛋白染色；最后用 DAPI 染细胞核 10 min。

3 实验结果与数据分析

3.1 大面积结构制备

3.1.1 大尺寸微结构

DMD 芯片尺寸为 1024 pixel × 768 pixel，微图案的设计尺寸与像素的关系根据公式： $L = \frac{13.68 \times \text{像素}}{N}$ 计算。其中： L 表示设计尺寸， N 是成像镜头的缩放倍数。图 3(a)~3(d) 是单场场内单图形的大空心微结构（相当于 2~3 倍成熟细胞尺寸），主要包括三角形、四角星、五角星和六边形，设计边宽为 7 μm~10 μm。本实验中，采用的物镜放大倍数为 50 ×，数值孔径为 0.8，一个子场的实际尺寸为 311.2 μm × 233.4 μm。在图形设计时，微图案的设计尺寸不能大于一个子场的尺寸。投影光刻中，设置曝光功率为 40 mW~50 mW（出光口），曝光时间为 700 ms。图 3(e)~3(h) 是投影曝光得到的微图案结构的 SEM 图。从图中可以看出，

曝光得到的水凝胶微图案具有良好的保真度，结构表面平整光滑，边缘清晰，图 3(i)~3(l) 是图 3(e)~3(h) 的局部放大图。

3.1.2 小尺寸微结构

对于细胞来说，如果图案化基本单元尺寸远大于细胞，图案化基底对单个细胞的调控效应不显著。考虑到这一现象，我们仿陷窝设计并制备了一系列小尺寸的多角形和多角星微图案。每个子场内包含 3×3 个基本图形单元，每个图形单元尺寸接近成纤维细胞，其空心模拟陷窝设计。图 4 是在不同曝光参数下获得的微图案结构的 SEM 图像。其中图 4(a) 中微图案的曝光功率为 50 μW~60 μW（物镜前），单次曝光时间为 700 ms，该条件下完成 8 mm × 8 mm 面积的模式化只需要 40 min。微图案具有完整的几何形貌和清晰的边缘，图案尺寸同设计基本一致。

值得注意的是，由于图形单元尺寸较小，DMD 芯片上对应的激光通道距离更近（单个子场内反射激光的白色图像部分更多，距离更近），激光光束之间的相互作用会对图案的成型产生影响。水凝胶基液态光刻胶，聚合前光刻胶体系是具有流动性的透明液体。图形尺寸小时，距离较近的几束激光辐照到光刻胶里面时，产生的自由基更多，由于光刻胶是液态，自由基更容易在内部扩散。不同微反射镜芯片对应的激光光束之间的相互作用会产生二次聚合，如图 4 所示，多角星的角形随着角的数目增加而逐渐变圆，甚至在底部产生薄薄的黏连聚合。而在多边形微图案中，随着边数的增加，图案形貌也趋近于圆形。同时，在四

边形和六边形中, 微图案单元之间的黏连比较明显。

当增大曝光功率到 $120\ \mu\text{W}\sim 140\ \mu\text{W}$ 时, 延长曝光时间到 $1500\ \text{ms}$, 获得的微结构的 SEM 图像如图 4(b) 所示, 只能观察到微图案大概的轮廓, 空心部分边缘

不清晰, 且聚合不均匀, 微图案分辨率和保真度都有所降低。进一步证明了自由基扩散和光在光刻胶中发生衍射是产生二次聚合的主要因素。以上研究结果表明, 投影光刻的曝光剂量越大, 二次聚合的影响也越

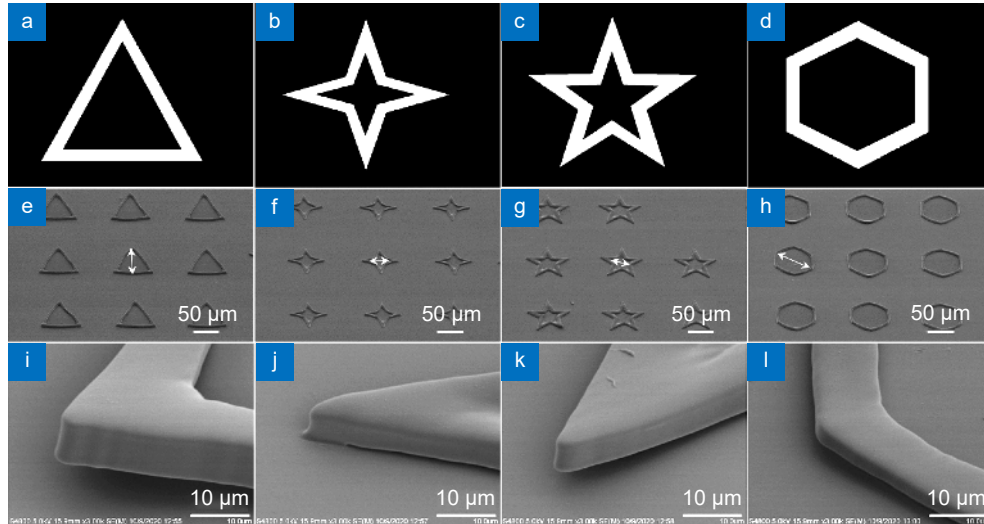


图 3 大尺寸微结构 SEM 图像。

(a)~(d) 大尺寸微结构设计图; (e)~(h) 拼接得到的大尺寸微结构 SEM 图像; (i)~(l) 大尺寸微结构的局部放大图

Fig. 3 SEM images of large-size microstructures.

(a)~(d) The designed pattern of large-size microstructures; (e)~(h) SEM images of large-size micropatterns;

(i)~(l) Enlarged local details of large-size micropatterns

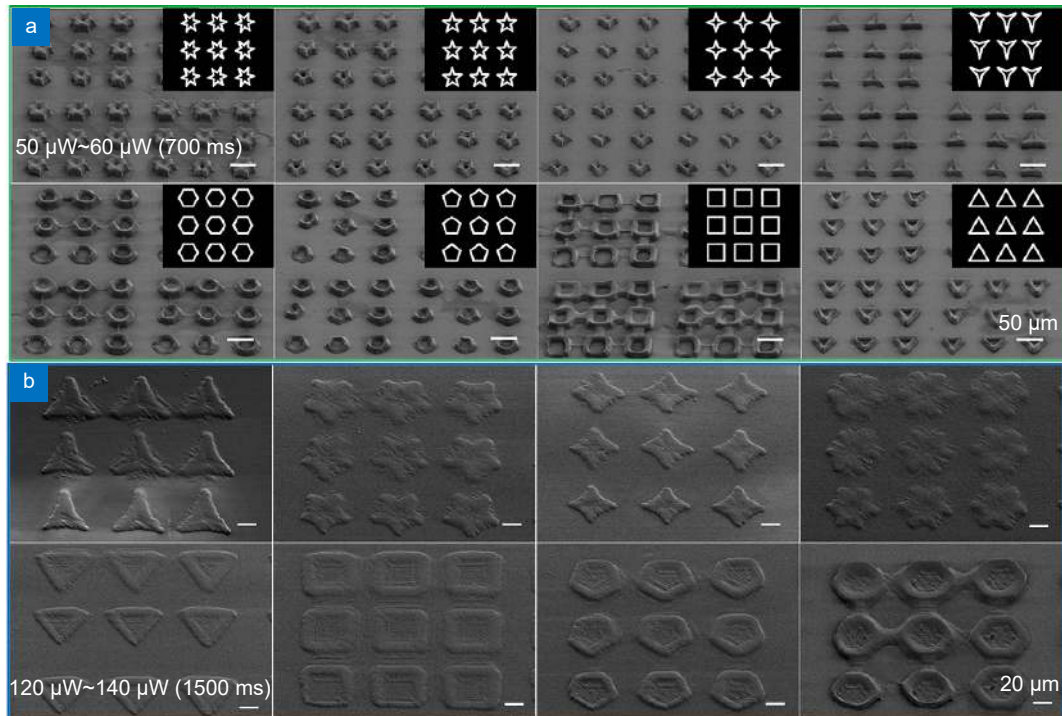


图 4 不同曝光条件下制备的小尺寸微结构。

(a) 激光功率 $50\ \mu\text{W}\sim 60\ \mu\text{W}$, 曝光时间 $700\ \text{ms}$; (b) 激光功率 $120\ \mu\text{W}\sim 140\ \mu\text{W}$, 曝光时间 $1500\ \text{ms}$

Fig. 4 Small-size microstructures prepared under different exposure conditions.

(a) Laser power is $50\ \mu\text{W}\sim 60\ \mu\text{W}$, exposure time is $700\ \text{ms}$; (b) Laser power is $120\ \mu\text{W}\sim 140\ \mu\text{W}$, exposure time is $1500\ \text{ms}$

大, 就难以获得符合预期分辨率的微图案阵列, 无法为细胞培养提供可控的地形线索, 预示着在选择液态光刻胶的最佳曝光条件时, 应该充分考虑图案的尺寸和布局。

3.2 浸润性能表征

由于基底表面微结构带来的地形变化对细胞的生长分布具有诱导作用, 细胞的形貌变化与微结构的几何特征存在显著的相关性。研究表明, 基底的亲疏水性对细胞在基底上的粘附、增殖、迁移也会产生影响^[38]。因此, 要了解图案化表面对细胞行为的诱导机制, 还需要考虑微结构本身带来的基底表面浸润性的差异。我们分别制备了具有不同形貌的大尺寸和小尺寸空心微结构, 并进行了接触角测试。每种微结构面积为 $8\text{ mm} \times 8\text{ mm}$ 。测试时, $2\text{ }\mu\text{L}$ 的水滴以 $0.5\text{ }\mu\text{L/s}$ 的速度滴下, 每个样品至少测五个点。接触角测试结果如图 5 所示, 图 5(a)~5(h) 是各基底接触角测试的光学显微图像, 图 5(i) 是各基底接触角的数值分析。从图中可以看出, 玻璃表面的接触角平均值大约为 72° (图 5(a))。大尺寸微结构中四角星接触角最小, 大约 61.12° , 三角形基底的接触角最大, 为 68.98° , 均小

于玻璃表面的接触角。小尺寸多角微结构中三角形和四角星接触角分别为 64.3° 、 65.12° , 略小于玻璃表面, 五角星最大, 为 71.38° 。以上数据表明, 这些微结构对表面的浸润性能会产生一定影响。

3.3 微结构与细胞共培养实验

为了研究不同尺寸的微结构对细胞行为的影响, 将成纤维细胞 L929 培养在上述大尺寸和部分小尺寸微图案上 48 h, 观察细胞在不同尺寸微结构上的生长形貌和功能的变化。图 6(a) 是大尺寸微结构上 L929 细胞的共聚焦荧光显微图像, 图 6(b) 是对应 SEM 图像, 而图 6(c) 是 6(b) 的局部 (白框标出) 放大图。三角形和六边形空心面积大, 对于单细胞而言, 只能接触到其中一个边或者一个角, 细胞这部分的铺展和粘附会受到边和角调控, 但整体上还是同在平整的二维平面上生长类似。如六边形中细胞的一端片状粘附在边上, 部分细胞的骨架布满整个边 (白框部分), 而在三角形中我们观察到细胞正在翻越三角形的一边, 细胞膜被拉成薄薄的片状, 紧裹在边上。四角星和五角星的空心面积相对较小, 只允许少数几个细胞粘附, 细胞生长过程中由于空间受限, 和在空间较大的多边

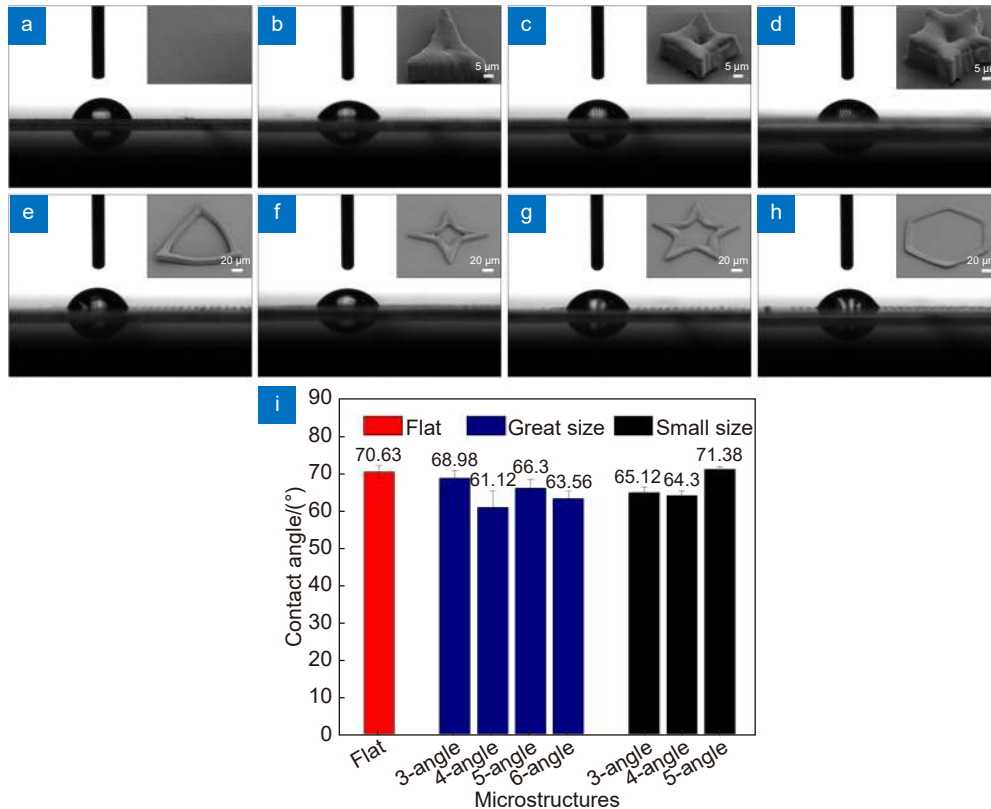


图 5 不同尺寸微结构表面的 (a)~(h) 接触角显微图像及 (i) 接触角分析

Fig. 5 (a)~(h) The bright field images of contact angle and (i) contact angle analysis of microstructures with different sizes

形内的细胞有明显的差异。如图中所示五角星的空心部分有三个细胞，四角星空心部分只有一个细胞。这两种微结构内的细胞与微结构的边、与其他细胞之间更容易产生交互作用。小空间带来的限位效应使得细

胞的伸展度比在多边形中小很多，进而影响细胞行为和功能。此外，粘附在图案外围的细胞，则同二维平面上相差不大，这说明微图案的尺寸在调控细胞生长中至关重要。

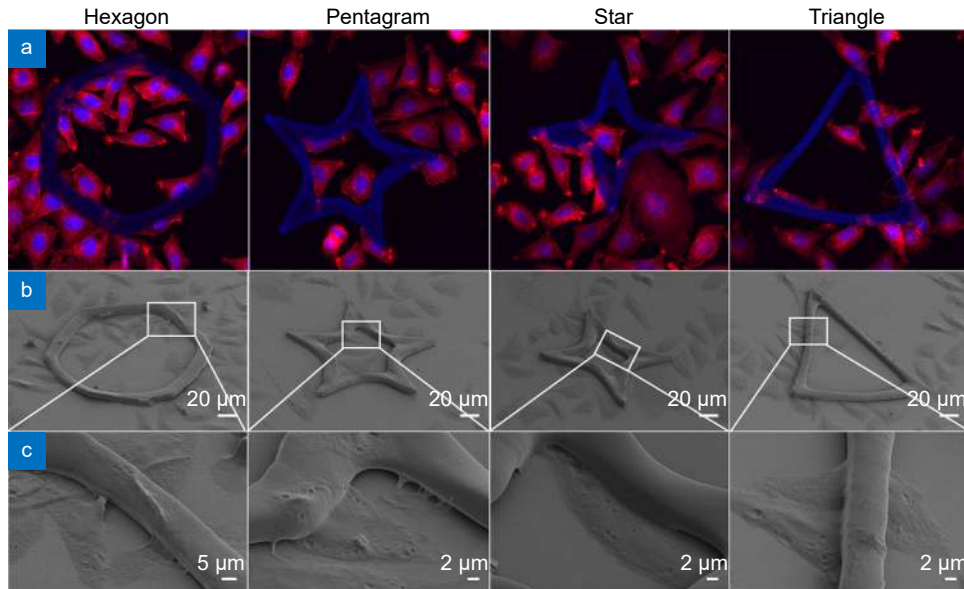


图 6 大尺寸微结构细胞培养 48 h 后的荧光及 SEM 图像。

(a) 共聚焦荧光显微图像，蓝色：DAPI 染色细胞核，激发波长 405 nm，收集波段 410 nm~460 nm，红色：ActinRed 555 染色肌动蛋白，激发波长 561 nm，收集波段 570 nm~620 nm；(b) SEM 图及 (c) 细节放大的 SEM 图

Fig. 6 Fluorescence and SEM images of cells cultured on large-size microstructures after 48 h.

(a) Confocal fluorescence images, blue: nuclei stained by DAPI, excitation wavelength is 405 nm, collected wavelength range is 410 nm~460 nm, red: actin stained ActinRed 555, excitation wavelength is 561 nm, collected wavelength range is 570 nm~620 nm;

(b) SEM images and (c) magnified SEM images of local details

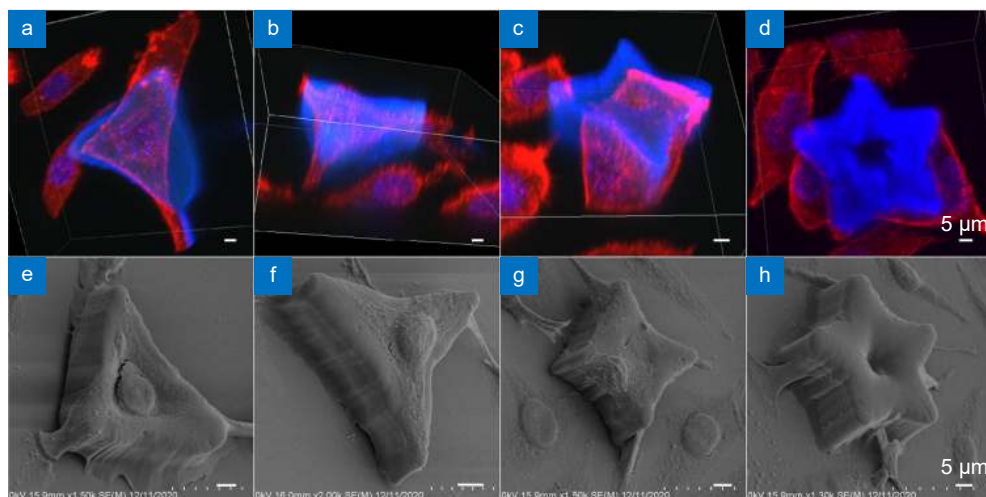


图 7 小尺寸微结构细胞培养 48 h 后的荧光及 SEM 图像。

(a)~(d) 三维的共聚焦荧光显微图像，蓝色：DAPI 染色细胞核，激发波长 405 nm，收集波段 410 nm~460 nm，红色：ActinRed 555 染色肌动蛋白，激发波长 561 nm，收集波段 570 nm~620 nm；(e)~(h) SEM 图

Fig. 7 Fluorescence and SEM images of cells cultured on small-size microstructures after 48 h.

(a)~(d) 3D confocal fluorescence images, blue: nuclei stained by DAPI, excitation wavelength is 405 nm, collected wavelength range is 410 nm~460 nm, red: actin stained ActinRed 555, excitation wavelength is 561 nm, collected wavelength range is 570 nm~620 nm; (e)~(h) SEM images

小尺寸微图案对细胞形貌的影响更明显, 图 7(a)、7(b) 中单个细胞的肌动蛋白完全覆盖整个三角形和三角星, 且沿着三个角延伸出去, 细胞形貌和微图案一致。而细胞核则正好嵌在三角形和三角星的中心陷窝里, 如图 7(e) 和 7(f) 所示。三角形具有较大的中心凹陷区, 因此成纤维细胞的细胞核可以完整落入其中, 而三角星的中心凹陷区则要小于细胞核。但在重力的影响下, 最终细胞核会落入凹陷处并半嵌在其中。而在四角星上, 也观察到细胞正向凹陷处迁移, 细胞前端的肌动蛋白铺满了四角星的一角, 越过凹陷向对角延伸 (图 7(c)), 细胞的尾部还没来得及攀到上表面, 但已经脱离了玻璃基底, 并收起了丝状伪足 (图 7(g))。在五角星上, 同样也观察到了细胞正在翻越微结构的边缘。细胞在小尺寸的多角微结构上的这种形貌适应性改变和分布, 为调控细胞行为提供了科学依据。

4 结 论

本研究中, 我们利用飞秒激光无掩模投影曝光技术, 结合液态生物相容性水凝胶材料, 直接在液相环境中曝光, 快速制备了不同尺寸和形貌的大面积空心微结构。细胞共培养实验证明, 大尺寸三边形和六边形微结构空腔较大, 除了同微结构的边框部分有交互作用外, 细胞的生长同在平面上基本相同。大尺寸四角星和五角星结构空腔相对较小, 只有两三个细胞大小, 细胞在空腔内由于限位作用, 形貌会受限, 拉长度降低, 方度增加, 这说明通过控制微结构尺寸大小能有效调控细胞形貌。同时, 在小尺寸的微结构上, 我们观察到细胞核会落入中心凹陷, 细胞骨架形貌则和微结构形貌保持一致, 细胞在这种复杂微结构上的形貌自适应性改变和分布, 为体外细胞接触诱导研究提供了一种新思路。

参考文献

- [1] Yu S Z, Liu D, Wang T Y, et al. Micropatterning of polymer substrates for cell culture[J]. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*, 2021, **109**(10): 1525–1533.
- [2] Ren K F, Hu M, Zhang H, et al. Layer-by-layer assembly as a robust method to construct extracellular matrix mimic surfaces to modulate cell behavior[J]. *Prog Polym Sci*, 2019, **92**: 1–34.
- [3] Yang J Y, Ting Y C, Lai J Y, et al. Quantitative analysis of osteoblast-like cells (MG63) morphology on nanogrooved substrata with various groove and ridge dimensions[J]. *J Biomed Mater Res Part A*, 2009, **90A**(3): 629–640.
- [4] Zhou X T, Hu J, Li J J, et al. Patterning of two-level topographic cues for observation of competitive guidance of cell alignment[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2012, **4**(8): 3888–3892.
- [5] Szabó Á, Liliom H, Fekete Z, et al. SU-8 microstructures alter the attachment and growth of glial cells in vitro[J]. *Mater Today Commun*, 2021, **27**: 102336.
- [6] Jahed Z, Molladavoodi S, Seo B B, et al. Cell responses to metallic nanostructure arrays with complex geometries[J]. *Biomaterials*, 2014, **35**(34): 9363–9371.
- [7] Nomura S, Kojima H, Ohyabu Y, et al. Nanopillar sheets as a new type of cell culture dish: detailed study of HeLa cells cultured on nanopillar sheets[J]. *J Artif Organs*, 2006, **9**(2): 90–96.
- [8] Kuo C W, Shiu J Y, Chien F C, et al. Polymeric nanopillar arrays for cell traction force measurements[J]. *Electrophoresis*, 2010, **31**(18): 3152–3158.
- [9] Chang R, Yan Q F, Kingshot P, et al. Harnessing the perinuclear actin cap (pnAC) to influence nanocarrier trafficking and gene transfection efficiency in skeletal myoblasts using nanopillars[J]. *Acta Biomater*, 2020, **111**: 221–231.
- [10] Robinson J T, Jorgolli M, Shalek A K, et al. Vertical nanowire electrode arrays as a scalable platform for intracellular interfacing to neuronal circuits[J]. *Nat Nanotechnol*, 2012, **7**(3): 180–184.
- [11] Cheng Y J, Zhu S Y, Pang S W. Directing osteoblastic cell migration on arrays of nanopillars and nanoholes with different aspect ratios[J]. *Lab Chip*, 2021, **21**(11): 2206–2216.
- [12] Yang J M, Olanrele O S, Zhang X, et al. Fabrication of hydrogel materials for biomedical applications[M]//Chun H J, Park K, Kim C H, et al. *Novel Biomaterials for Regenerative Medicine*. Singapore: Springer, 2018: 197–224.
- [13] Yu H, Liu J, Zhao Y Y, et al. Biocompatible three-dimensional hydrogel cell scaffold fabricated by sodium hyaluronate and chitosan assisted two-photon polymerization[J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2019, **2**(7): 3077–3083.
- [14] Zheng Y C, Zhao Y Y, Zheng M L, et al. Cucurbit[7]uril-carbazole two-photon photoinitiators for the fabrication of biocompatible three-dimensional hydrogel scaffolds by laser direct writing in aqueous solution[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, **11**(2): 1782–1789.
- [15] Wei S X, Liu J, Zhao Y Y, et al. Protein-based 3D microstructures with controllable morphology and pH-responsive properties[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, **9**(48): 42247–42257.
- [16] Zhang W C, Zheng M L, Liu J, et al. Modulation of cell behavior by 3D biocompatible hydrogel microscaffolds with precise configuration[J]. *Nanomaterials*, 2021, **11**(9): 2325.
- [17] Gao W, Chao H, Zheng Y C, et al. Ionic carbazole-based water-soluble two-photon photoinitiator and the fabrication of biocompatible 3D hydrogel scaffold[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, **13**(24): 27796–27805.
- [18] Zheng C L, Jin F, Zhao Y Y, et al. Light-driven micron-scale 3D hydrogel actuator produced by two-photon polymerization microfabrication[J]. *Sens Actuators B Chem*, 2020, **304**: 127345.
- [19] Feng L, Liang S J, Zhou Y Y, et al. Three-dimensional printing of hydrogel scaffolds with hierarchical structure for scalable stem cell culture[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2020, **6**(5): 2995–3004.
- [20] González-Henríquez C M, Rodríguez-Umanzor F E, Sarabia-Vallejos M A, et al. Innovative procedure for precise deposition of wrinkled hydrogel films using direct inkjet printing[J]. *Mater Des*, 2020, **194**: 108959.

- [21] Kim D H, Kim P, Song I, et al. Guided three-dimensional growth of functional cardiomyocytes on polyethylene glycol nanostructures[J]. *Langmuir*, 2006, **22**(12): 5419–5426.
- [22] Erkoç-Biradlı F Z, Ozgun A, Öztürk-Öncel Ö, et al. Bioinspired hydrogel surfaces to augment corneal endothelial cell monolayer formation[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2021, **15**(3): 244–255.
- [23] Li G C, Li S J, Zhang L L, et al. Construction of biofunctionalized anisotropic hydrogel micropatterns and their effect on Schwann cell behavior in peripheral nerve regeneration[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, **11**(41): 37397–37410.
- [24] Kim G, Jung Y, Cho K, et al. Thermoresponsive poly(*N*-isopropylacrylamide) hydrogel substrates micropatterned with poly(ethylene glycol) hydrogel for adipose mesenchymal stem cell spheroid formation and retrieval[J]. *Mater Sci Eng C*, 2020, **115**: 111128.
- [25] Noh S, Gong H Y, Lee H J, et al. Electrically conductive micropatterned polyaniline-poly(ethylene glycol) composite hydrogel[J]. *Materials*, 2021, **14**(2): 308.
- [26] Noh M, Choi Y H, An Y H, et al. Magnetic nanoparticle-embedded hydrogel sheet with a groove pattern for wound healing application[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2019, **5**(8): 3909–3921.
- [27] Diez M, Schulte V A, Stefanoni F, et al. Molding micropatterns of elasticity on PEG-based hydrogels to control cell adhesion and migration[J]. *Adv Eng Mater*, 2011, **13**(10): B395–B404.
- [28] Ha M, Athirasala A, Tahayeri A, et al. Micropatterned hydrogels and cell alignment enhance the odontogenic potential of stem cells from apical papilla in-vitro[J]. *Dent Mater*, 2020, **36**(1): 88–96.
- [29] Rahmouni S, Lindner A, Rechenmacher F, et al. Hydrogel micropillars with integrin selective peptidomimetic functionalized nanopatterned tops: a new tool for the measurement of cell traction forces transmitted through $\alpha_v\beta_3$ -or $\alpha_5\beta_1$ -integrins[J]. *Adv Mater*, 2013, **25**(41): 5869–5874.
- [30] Morishima K, Tanaka Y, Ebara M, et al. Demonstration of a bio-microactuator powered by cultured cardiomyocytes coupled to hydrogel micropillars[J]. *Sens Actuators B Chem*, 2006, **119**(1): 345–350.
- [31] Lee J Y, Shah S S, Yan J, et al. Integrating sensing hydrogel microstructures into micropatterned hepatocellular cocultures[J]. *Langmuir*, 2009, **25**(6): 3880–3886.
- [32] Lee H J, Kim D N, Park S, et al. Micropatterning of a nanoporous alumina membrane with poly(ethylene glycol) hydrogel to create cellular micropatterns on nanotopographic substrates[J]. *Acta Biomater*, 2011, **7**(3): 1281–1289.
- [33] Peng R, Yao X, Ding J D. Effect of cell anisotropy on differentiation of stem cells on micropatterned surfaces through the controlled single cell adhesion[J]. *Biomaterials*, 2011, **32**(32): 8048–8057.
- [34] Chen S J, Zhang L G, Zhao Y, et al. A perforated microhole-based microfluidic device for improving sprouting angiogenesis in vitro[J]. *Biomicrofluidics*, 2017, **11**(5): 054111.
- [35] Emami M M, Barazandeh F, Yaghmaie F. Scanning-projection based stereolithography: method and structure[J]. *Sens Actuators A Phys*, 2014, **218**: 116–124.
- [36] Liu Y H, Zhao Y Y, Jin F, et al. *M*/12 super resolution achieved in maskless optical projection nanolithography for efficient cross-scale patterning[J]. *Nano Lett*, 2021, **21**(9): 3915–3921.
- [37] Gao W, Zheng M L, Jin F, et al. Fast fabrication of large-area two-dimensional micro/nanostructure by femtosecond laser[J]. *Laser Optoelect Prog*, 2020, **57**(11): 111421.
高文, 郑美玲, 金峰, 等. 飞秒激光快速制备大面积二维微纳结构[J]. *激光与光电子学进展*, 2020, **57**(11): 111421.
- [38] Wang Y W, Wu Q, Chen G Q. Reduced mouse fibroblast cell growth by increased hydrophilicity of microbial polyhydroxyalkanoates via hyaluronan coating[J]. *Biomaterials*, 2003, **24**(25): 4621–4629.

作者简介



张维彩 (1994-), 女, 博士研究生, 从事光功能材料的设计、合成及利用飞秒激光直写制备多尺度微纳结构研究工作, 研究方向: 水凝胶微结构的制备及其对细胞行为的诱导调控研究。

E-mail: zwc13269500627@163.com



【通信作者】郑美玲 (1981-), 女, 博士, 研究员, 拥有理、工学双博士学位, 主持多项科技部、基金委、中科院项目, 已发表研究论文 100 篇, 申请专利 10 余项, 邀请报告 20 余次, 多次获会议最佳奖。研究方向: 光功能材料及超快激光微纳加工。

E-mail: zhengmeiling@mail.ipc.ac.cn

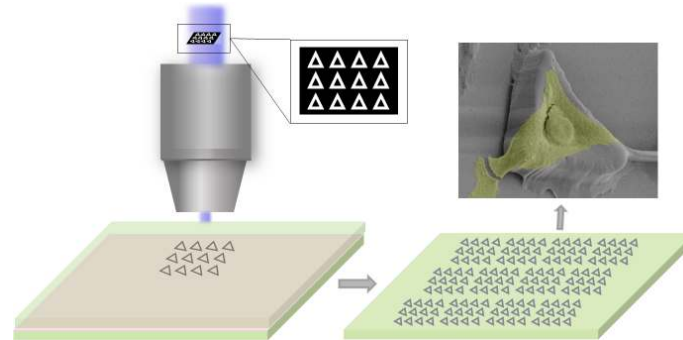
团队介绍

中国科学院理化技术研究所有机纳米光子学课题组主要以化学、材料、光学、物理等学科为基础, 重点开展有机光功能材料、激光微纳加工技术、功能结构与器件制备及应用等方面的研究。现有固定人员 4 名, 含正高级 1 名, 副高级 2 名, 中级 1 名, 10 余名在读研究生。已建成材料合成实验室和含千级超净间的光学实验室, 拥有世界先进水平的飞秒激光器及放大级、纳秒激光器、连续激光器、飞秒激光双光子微纳结构加工平台、激光共聚焦显微镜、激光拉曼显微镜、傅里叶红外光谱仪等材料与结构加工与表征平台。承担国家科技部、基金委、中科院、北京市等多项重大项目, 取得了一系列具有国际领先水平的成果, 已在国内外期刊发表 100 多篇论文并申请 20 多项专利。



Rapid preparation of high-precision hydrogel micropatterns and its induction of cell behavior

Zhang Weicai^{1,2}, Zheng Meiling^{1*}, Dong Xianzi¹, Liu Jie¹, Jin Feng¹



Induction of cell behavior on large-area hydrogel micropattern fabricated by femtosecond laser maskless optical projection lithography

Overview: Previous researches have indicated that pattern surfaces usually exhibit contact induction effects on cells. The microstructure can effectively regulate the adhesion and proliferation of cells. Cell morphology and cellular function are inseparable. For example, stem cells have a large degree of differentiation of different lineage depending on the adhesion form of the cell. Nanostructures affect cell adhesion behavior at the molecular level. Nanowires have been used to stimulate and record individual neuronal activities, and nanopores can be used for single-cell detection. Therefore, it will bring significant contributions to the fields of organizational engineering to create a variety of scales, different topological substrate in vitro to investigate cell-material, cell-environmental interaction mechanism.

Hydrogels are commonly used in tissue engineering since they have a similar component to the extracellular matrix and have advantages such as good biocompatibility, non-toxic and degradability. A large number of bionic cell scaffolds have been prepared by techniques such as microfluidic technology, 3D printing, soft printing, self-assembly, ultraviolet photolithography etc. This provides important guidance for cancer transfer, wound healing and inflammatory treatment. However, the sizes of these microstructures are usually large with a relatively low structure resolution, accounting for the limitation of hydrogel properties and manufacturing methods. Thus, it is still a challenge to rapidly fabricate large-area hydrogel micro/nano-structures with complex and arbitrary patterns.

In this paper, we have prepared the hydrogel by using PEGDA, PE-3A and the mixing photoinitiators (Irgure 369 and Benzil) with the weight ratios of 39.2: 59.2: 0.8: 0.8. A home-made maskless optical projection photolithography system is used to fabricate hydrogel patterns. A femtosecond laser, as the light source and high numerical aperture objective lens are used to improve structural resolution, and a splicing method is used to obtain large-area structures with high processing efficiency. Large-area polygons and polygonal stars with cavities in the center of itself are fabricated. First, the optimum processing conditions and the wettability of substrate with different patterns are studied. Then, Fibroblasts L929 are cultured on all kinds of pre-fabricated patterns. The cell behavior in micropattern with large cavity is similar to those on 2D flat substrates. Only the skeleton of cells close to the microstructure will produce deformation and interaction. For micropatterns with small sizes of cavities, the length of cells is significantly reduced because of the small space limit. In particular, the cell skeleton on the small-sized micropatterns exhibits a consistent distribution of the topography. The nuclear would fall into the center depression likes “bone trap” due to gravity. This study indicates that the size of microstructural pattern units is very important for inducing cell behavior and function, which would provide a novel method to prepare hydrogel micropatterns to study cell behavior in the field of organizational engineering.

Zhang W C, Zheng M L, Dong X Z, et al. Rapid preparation of high-precision hydrogel micropatterns and its induction of cell behavior[J]. *Opto-Electron Eng*, 2022, 49(2): 210336; DOI: [10.12086/oe.2022.210336](https://doi.org/10.12086/oe.2022.210336)

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (61975213, 61475164, 51901234), Cooperative R&D Projects between Austria, FFG and China, CAS (GJHZ1720), and International Partnership Program of Chinese Academy of Sciences (GJHZ2021130)

¹Laboratory of Organic NanoPhotonics and CAS Key Laboratory of Bio-Inspired Materials and Interfacial Science, Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China; ²School of Future Technology, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101407, China

* E-mail: zhengmeiling@mail.ipc.ac.cn