

刚性基底表面图案化氧化石墨烯 对细胞粘附行为调控

徐盼举,邢 赟,许为中,黄 敏,刘爱萍

(浙江理工大学,a.物理系;b.光电材料与器件中心,杭州 310018)

摘 要:生物材料的物理化学性质(如刚度、粗糙度、亲疏水性等)对细胞的粘附、增殖、迁移、分化、凋亡等一系列生命活动会产生重要的影响。此外,对材料进行图案化设计也是调控细胞生命活动的一种有效手段。采用软光刻的方法,以聚二甲基硅氧烷为印章,通过调节压力,获得图案较为规整的氧化石墨烯(GO)阵列。在优化的压力条件下,成功将GO阵列转移至硅、类金刚石膜、氧化铟锡玻璃三种刚性基底表面。利用基底材料与GO材料性能的差异,实现了对神经细胞(PC12)选择性粘附的有效调控。研究表明:与刚性基底相比,硬度较小且亲水的GO表面更能有效促进PC12细胞的选择性粘附和增殖。GO阵列表面越大,其表面粘附的细胞密度越大。

关键词:氧化石墨烯;阵列材料;刚性基底;细胞选择性粘附

中图分类号: Q689

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2017)06-0778-07

0 引 言

神经功能电路丧失和有效神经元再生失败是各种神经系统疾病发病的主要原因,例如,阿尔茨海默病、帕金森病、多发性脑硬化、创伤性脑损伤等。采用恰当的方法对体内神经结构和组织进行体外模拟,可以阐明这些疾病形成的机制,从而为受损神经修复和再生提供有效方案。在细胞生物学研究中,将细胞图案化是研究相关疾病致病机理的有效方法。可以借助具有微图案的生物基底材料,利用其独特的形貌特征和微/纳米结构,实现对细胞粘附形态、功能和活性的调控^[1-3],在揭秘相关致病机制中起到重要作用。

近年来,石墨烯及其衍生物,如氧化石墨烯(GO)和还原氧化石墨烯(rGO),被广泛应用于生物医学领域,如肿瘤治疗^[4-6]、药物运输^[7-9]、生物成像^[10-12]等。大量研究表明:GO具有两亲性、蜂窝状碳结构以及独特的表面化学特性,可有效地调控细胞的生

命活动^[13-14]。另外,GO表面可以为细胞提供一定的侧向应力,使细胞骨架产生局部张力,促进细胞骨架在GO表面锚定位点的形成^[15]。GO或rGO表面也能为细胞生长提供一定的应变或褶皱^[16],进而富集某些利于细胞生长的生长因子^[17],调节细胞的各种生命活动。在神经组织工程中,具有较高电子传导速率的石墨烯或rGO还可以作为细胞的刺激电极,在较小的免疫反应条件下,加强与分化神经元的电耦合^[18]。在生物体内部,神经细胞被柔性组织包围,使得神经细胞更倾向于生长在比较柔软的材料上^[19-20],而细胞所处界面的材料力学^[21]、基底形貌^[22]以及基底刚度^[23]对细胞的粘附皆会产生影响。因此,了解神经细胞与材料界面间的相互作用非常重要。

本文主要通过软光刻的方法,在不同刚性基底表面构筑图案化GO阵列材料,通过基底材料与GO刚性的差异,考察神经细胞(PC12)的粘附行为。

收稿日期:2017-04-27 网络出版日期:2017-08-07

基金项目:国家自然科学基金项目(51272237, 51572242);浙江省自然科学基金项目(LY16E020011);浙江理工大学521人才培养计划

作者简介:徐盼举(1991-),男,河北邯郸人,硕士研究生,主要从事无机纳米材料合成及应用方面的研究。

通信作者:刘爱萍,E-mail:aipingwz@163.com

1 实验

1.1 实验材料和仪器

实验材料:石墨粉(C)购自阿拉丁试剂有限公司;磷酸(H_3PO_4)、硫酸(H_2SO_4)和高锰酸钾(KMnO_4)为浙江三鹰化学试剂有限公司生产。试验中使用的化学试剂均为分析纯。光刻胶(研究级)由苏州瑞红电子化学品有限公司生产。聚二甲基硅氧烷(PDMS)制备所需 SYLGARD 184 硅橡胶(预聚物和固化剂)由美国道康宁公司生产。实验过程中所用去离子水的电阻率 $\rho \geq 18 \Omega \cdot \text{cm}$ 。实验采用三种刚性基底材料,分别为单晶硅片(Si)(苏州协鑫光伏科技有限公司)、非晶碳(DLC)薄膜(胜倍尔超强镀膜(苏州)有限公司)、氧化铟锡(ITO)玻璃(武汉晶格太阳能科技有限公司)。

实验仪器:URE-2000/25 紫外光刻机(中科院光电技术研究所),氧气(O_2)等离子刻蚀机(沈阳科友真空设备有限公司),CB-1B 匀胶烘胶一体机(北京创维纳科技有限公司),VK-X10 激光显微镜(Keyence 公司),BX51 荧光生物显微镜(OLYMPUS 公司),S-4800 冷场发射扫描电子显微镜(SEM, 日本 Hitachi 公司),FTIR-ATR(Nicolet 5700)傅里叶变换红外光谱仪(美国热电公司),OCAH200 静态接触角测量仪(德国 Dataphysics)。

1.2 GO 的制备

参照文献[24]中报道的方法制备 GO,即将 120.0 mL 浓 H_2SO_4 和 13.3 mL 浓 H_3PO_4 混合物溶液加入到 1.0 g 石墨粉和 6.0 g KMnO_4 混合物中,升温至 50°C 持续搅拌 12 h。反应完成后,冷却至室温,加入 150.0 mL 冰水和 3.0 mL 30% 双氧水(体积百分比浓度),得到亮黄色悬浮液。在 4000 r/min 条件下离心,除去残留的石墨粒。然后依次用 70.0 mL 水、70.0 mL 30% 的 HCl(体积百分比浓度)和 70.0 mL 乙醇洗涤剩余的固体物质两次,至溶液接近中性。将所得物质在 -80°C 下冷冻干燥过夜,得到干燥的 GO 粉体。配制浓度为 2.0 mg/mL 的 GO 悬浮液,超声分散均匀后使用。

1.3 PDMS 转印印章的制备

将 ITO 玻璃切割成大小为 $6.0 \text{ mm} \times 1.2 \text{ mm}$, 分别用丙酮、乙醇、去离子水超声清洗, 70°C 烘干,然后用酒精棉擦拭表面印迹,放置在匀胶烘台上 100°C 烘烤。在 800、5000、1000 r/min 条件下进行匀胶,使光刻胶均匀旋涂到基底表面,时间分别为 5、30、5 s。 100°C 下预烘 2 min 后,借助玻璃掩模板

在紫外光刻机上曝光 20 s;曝光完成后,后烘 60 s,然后在 0.3 mol/L 的氢氧化钠溶液中显影约 12 s,除去经过紫外光照而变性的光刻胶部分,形成凹槽状图案,即得到图案化的光刻胶模板(用于浇铸 PDMS,制作 PDMS 印章)。

PDMS 印章经过交联聚合得到。即将 SYLGARD 184 硅橡胶两组分预聚物和配套固化剂按照 10:1 的质量比进行混合,搅拌均匀后在真空干燥箱中负压排尽气泡,然后浇铸在光刻模板表面上(若浇铸时再次产生气泡,则再次减压排除气泡,确保 PDMS 预聚物中没有气泡,以防止对模板结构的破坏),常压 80°C 环境下交联聚合 2 h。待 PDMS 充分聚合后剥离,并进行切割,得到具有微结构的 PDMS 印章,面积为 0.36 cm^2 。

1.4 GO 阵列的制备

使用 O_2 等离子刻蚀对 PDMS 印章表面处理 5 min 以增加其亲水性。然后将 2.0 mg/mL 的 GO 溶液约 50.0 μL 滴加到 PDMS 印章表面,依次在 800、1500、3000 r/min 下旋涂 5、20、10 s,相同参数下旋涂 GO 溶液 3 次,然后将 PDMS 贴合在洁净的基底(硅片、DLC、ITO 玻璃)表面。轻轻挤压 PDMS 排出两者接触产生的气泡,使 PDMS 与基底形成良好的界面接触。然后在 PDMS 印章表面上施加不同压力,维持 12 h。最后将 PDMS 印章与基底剥离,这样 GO 阵列就从 PDMS 表面转移到基底表面上。图 1 为 GO 阵列制备的简易流程。

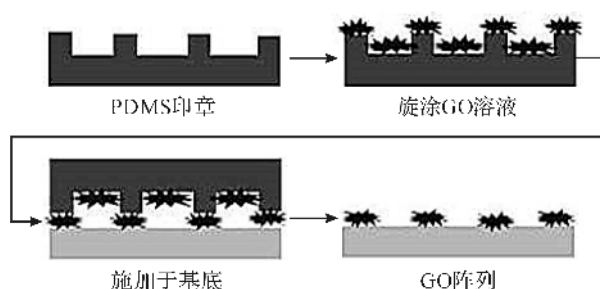


图1 GO阵列的制备流程

1.5 细胞培养

样品经过酒精灭菌后,使用磷酸缓冲溶液(PBS, $\text{pH}=7.4$)清洗。然后放入含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗(链霉素和青霉素)的细胞培养基中,在培养箱中孵化 30 min 后接种神经细胞 PC12,接种密度约 6000 个/mL。细胞培养无菌细胞房内进行,所用仪器试剂皆为专用无菌试剂或经灭菌的仪器。细胞培养环境为温度 37°C 、5% CO_2 、100% 湿度的无菌细胞培养箱。接种细胞培养 24 h

后,样品使用 4.0 %多聚甲醛固定,然后进行观察。不同尺寸 GO 表面细胞培养 48 h 后,使用鬼笔环肽 (Actin-Stain⁵⁵⁵ Phalloidin) 对细胞骨架肌动蛋白进行标记;使用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 对细胞核进行标记,最后通过荧光生物显微镜观察。

2 结果与讨论

2.1 PDMS 模板的形貌

图 2 为使用激光显微镜在 680 nm 激光光源下,对模板表面进行点、线、面扫描的平面图、结构

尺寸图和三维图像。图 2(a) 为光刻后产生的模板,圆盘尺寸为 $45\ \mu\text{m}$,两者之间连接长度 $45\ \mu\text{m}$,宽 $10\ \mu\text{m}$,光刻后模板尺寸与设定尺寸比较符合。图 2(b) 为浇铸 PDMS 后制得的 PDMS 印章,可以看出其结构与光刻所产生模板结构相反,图形高度约为 $2.2\ \mu\text{m}$,且其表面较为平整,适合转印 GO 使用。图 2(c) 为通过软刻蚀的方法转印得到的 GO 图形,与模板尺寸相似,厚度约为 $20\ \text{nm}$ 。由此可以得出,通过软光刻技术实现了 GO 阵列的制备。

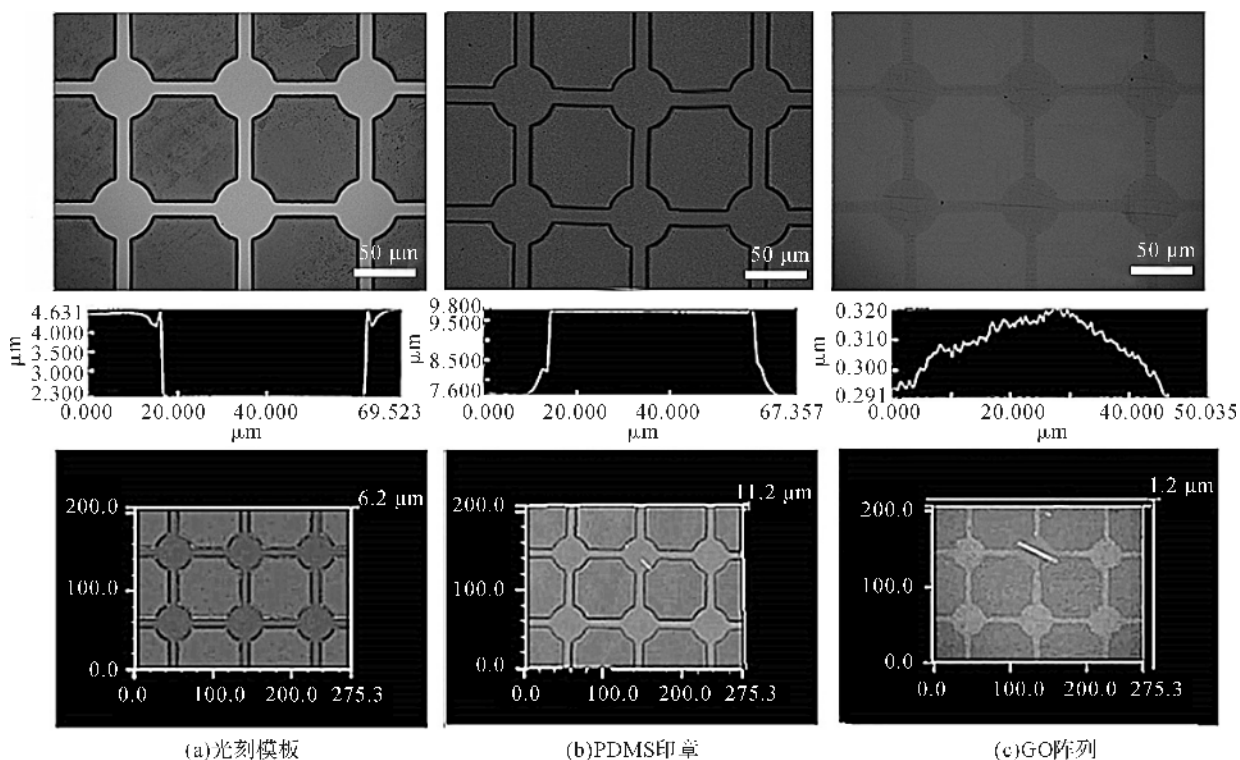


图 2 不同阵列样品的激光显微镜形貌图(从上到下依次为平面图、结构尺寸图和三维图像)

2.2 施加压力对不同刚性基底表面 GO 成膜的影响

2.2.1 不同施加压力对 GO 成膜质量的影响

图 3 为 ITO 基底上 PDMS 印章表面施加不同压力后转印出的 GO 薄膜的效果图。从实验结果分析可以得出,随着转印压力的增大薄膜变得均匀规整。压力较小时($0.25\ \text{N}$),印章与基底的接触不紧密,作用力小,GO 不能克服与 PDMS 间的分子作用力,因而不能从 PDMS 表面较为完整的脱离,无法在基底表面形成均匀规整的 GO 图案,如图 3(a);随着 PDMS 印章表面施加的压力的增加,PDMS 模板表面 GO 与基底表面作用力逐渐增强,基底表面成膜的质量增加;当达到临界压力 $0.50\ \text{N}$ 时,基底表面与 GO 的结合能大于 GO 与 PDMS 表面的分子作用力,GO 从印章表面剥离,形成比较均匀规整的阵

列,如图 3(d),GO 薄膜的厚度约 $20\ \text{nm}$ (如图 2(c));而当施加压力过重(大于 $1.00\ \text{N}$),PDMS 印章表面微结构由于过压发生弯曲,造成阵列结构以外区域的 GO 与基底接触,如图 3(f)。因此,施加压力在 $0.45\sim 0.55\ \text{N}$ 范围内转移的 GO 能较好成膜。在后续试验中,本文选择 $0.50\ \text{N}$ 作为最佳的施加压力。

2.2.2 最佳压力下不同刚性基底表面 GO 的成膜质量

图 4 为最佳压力 $0.50\ \text{N}$ 条件下,在 Si、DLC、ITO 三种刚性基底表面上得到的 GO 阵列的 SEM 图片。虽然 GO 与不同基底表面的结合能力有所差异,PDMS 表面经过 O_2 等离子刻蚀处理 $5\ \text{min}$ 后,再在最佳压力 $0.50\ \text{N}$ 条件下,均可以得到均匀规整的 GO 图案。

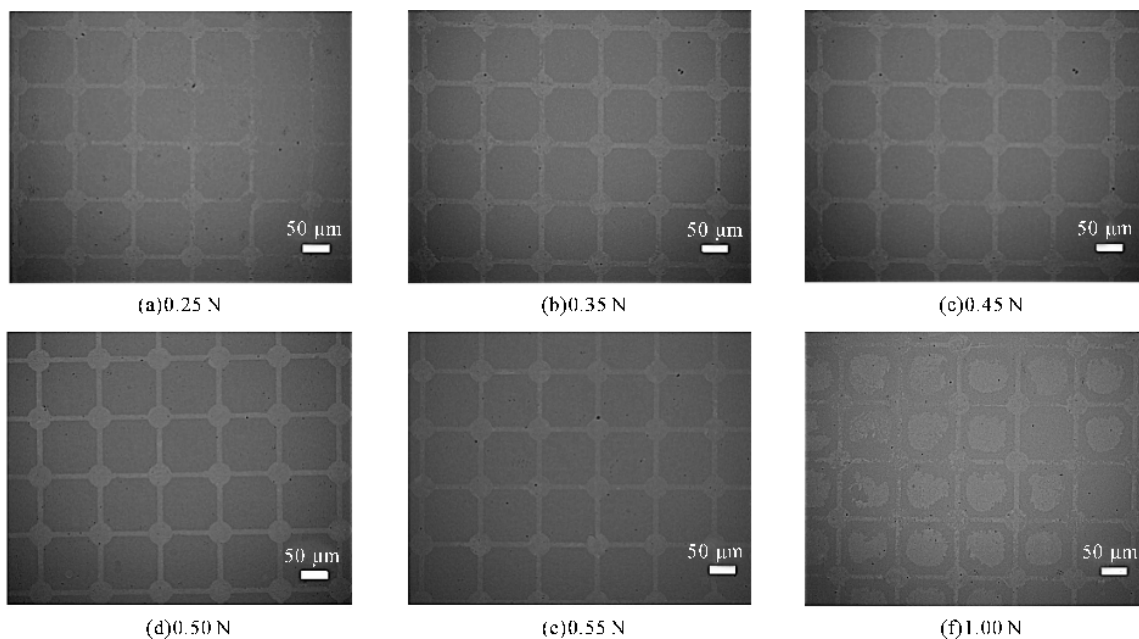


图 3 不同转印压力下得到的 GO 阵列的激光显微镜图

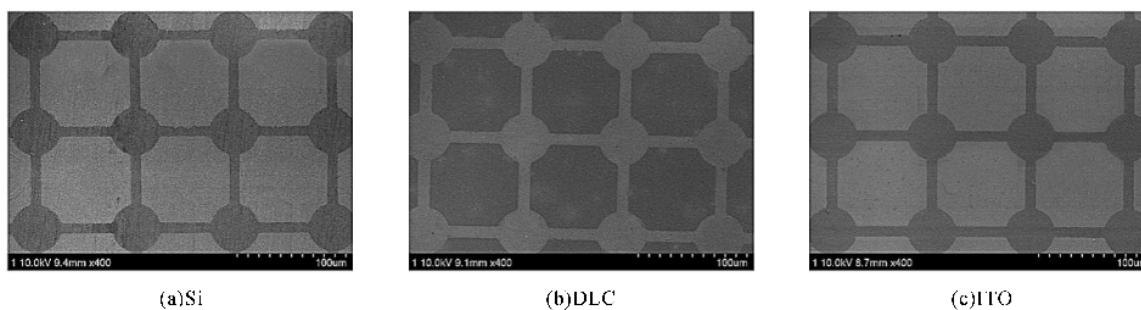


图 4 不同刚性基底表面 GO 阵列的扫描电子显微镜 (SEM) 图 (压力 0.50 N)

2.3 不同刚性基底表面 GO 阵列对细胞行为的调控

图 5 为不同刚性基底上 GO 阵列表面神经细胞 PC12 粘附生长的显微镜图片。尽管基底不同,但细胞更倾向于在 GO 表面粘附生长,可见 GO 比其他基底更具生物兼容性。图 6 为不同基底上细胞密度统计,从 GO 与基底表面细胞数量对比可以看出,基底与 GO 的差异性越大,细胞越趋于生长在 GO 表面,实现细胞选择性粘附。根据文献[25]报道,基底刚度影响细胞在基底上粘附时粘附复合物的稳定性,基底硬度增大不利于复合物稳定存在,因此细胞不易

粘附。表 1 为不同基底材料的硬度。Si 和 DLC 的刚度大于 ITO 的刚度,因此在 GO 存在时,GO 与 Si 或 DLC 的差异性相对较大,细胞的选择性粘附能力更强。此外,由于 Si 基底的接触角更大,表面更加光滑,因此 Si 基底表面 GO 阵列调控细胞选择性粘附的能力更强。GO 表面丰富的含氧基团(如图 7 所示,在 1630 、 1740 和 1240 cm^{-1} 分别对应于 $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOH}$ 和环氧基团)有利于细胞粘附复合物的稳定,其粗糙(见图 2(c) GO 轮廓图)、亲水表面也为细胞提供了更多的粘附位点^[15],利于细胞粘附生长。

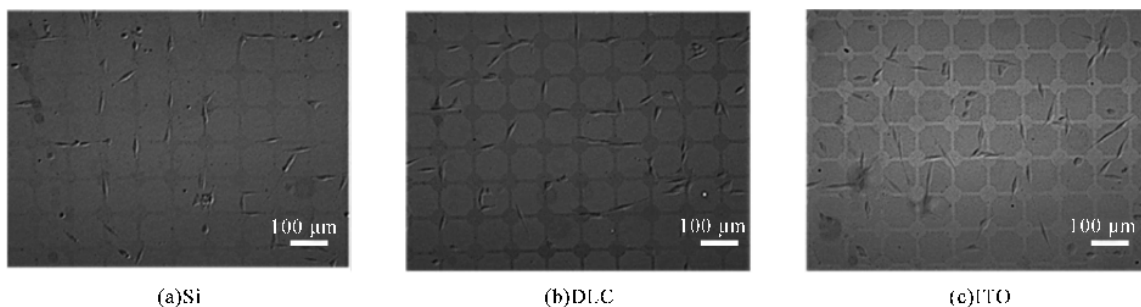


图 5 不同刚性基底上 GO 阵列表面细胞的粘附增长状态

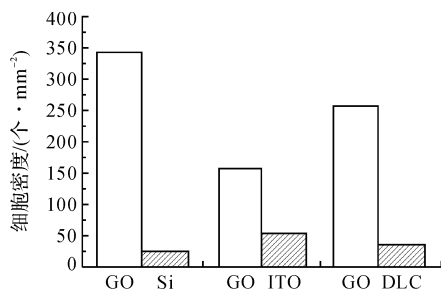


图6 不同刚性基底上GO阵列表面细胞分布密度

表1 不同基底材料的硬度参数^[26-30]及接触角

基底	Si	ITO	DLC	GO
刚度/GPa	14	12	20	2
接触角/(°)	79	83	75	20

此外,在ITO刚性基底上制备了不同尺寸的GO条状阵列(间距均为40 μm),接种细胞后孵育48 h,观察细胞粘附的明场图(上排)及对应的荧光染色图(下排),见图8。从图8中看到,细胞均生长在

GO阵列表面,并沿着条带方向生长。GO表面细胞更加伸展,呈现出纺锤状。随着尺寸增加,GO使得表面细胞粘附复合物在表面富集^[17],提供给细胞更多的粘附位点,细胞密度迅速增加,促进细胞增殖。可见,GO阵列相对较“软”,有利于细胞选择性粘附和增殖。

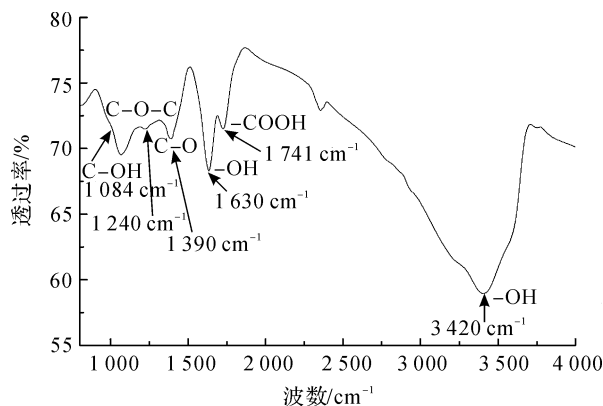


图7 GO的红外图谱

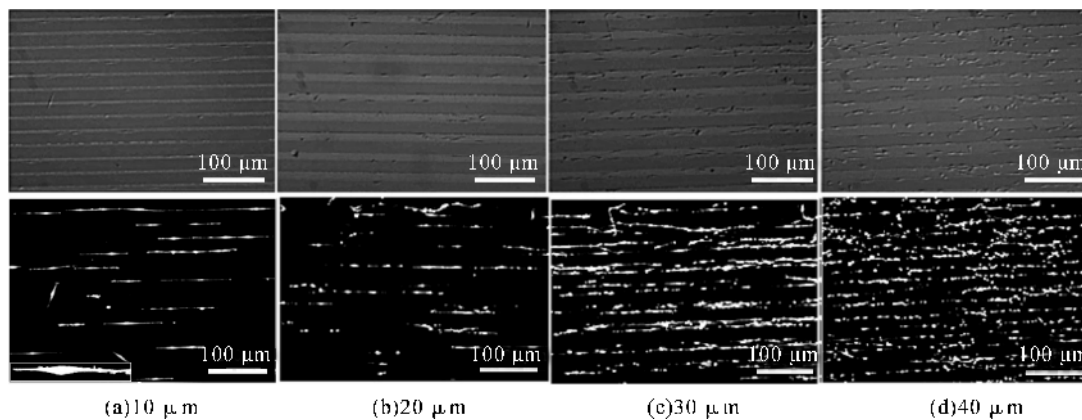


图8 不同尺寸GO条状阵列表面的细胞粘附(上图是明场图,下图是细胞荧光染色图)

3 结论

采用软光刻技术,在不同刚性基底表面构筑了氧化石墨烯阵列,通过基底与GO之间性能的差异,实现对神经细胞粘附行为的调控。相对于刚性基底,硬度较小且亲水的GO表面更利于细胞的粘附生长,表现出优异的生物相容性;刚性越大的基底越不利于神经细胞粘附。本文通过调控不同材料特性差异实现对细胞粘附的选择性调控,可为细胞与材料界面间的相互作用及细胞生物学研究提供参考。

参考文献:

[1] AGARWAL S, ZHOU X, YE F, et al. Interfacing live

cells with nanocarbon substrates [J]. *Langmuir*, 2010, 26(4):2244-2247.

[2] GUO C X, ZHENG X T, LU Z S, et al. Biointerface by cell growth on layered graphene-artificial peroxidase-protein nanostructure for in situ quantitative molecular detection [J]. *Advanced Materials*, 2010, 22(45):5164-5167.

[3] HESS L H, JANSEN M, MAYBECK V, et al. Graphene transistor arrays for recording action potentials from electrogenic cells [J]. *Advanced Materials*, 2011, 23(43):5045-5049.

[4] YANG K, WAN J, ZHANG S, et al. The influence of surface chemistry and size of nanoscale graphene oxide on photothermal therapy of cancer using ultra-low laser power [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(7):2206-2214.

[5] FIORILLO M, VERRE A F, ILIUT M, et al.

- Graphene oxide selectively targets cancer stem cells, across multiple tumor types; Implications for non-toxic cancer treatment, via “differentiation-based nano-therapy”[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(6): 3553-3562.
- [6] ZHANG W, GUO Z, HUANG D, et al. Synergistic effect of chemo-photothermal therapy using PEGylated graphene oxide [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(33): 8555-8561.
- [7] LIU J, CUI L, LOSIC D. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications [J]. *Acta Biomaterialia*, 2013, 9(12): 9243-9257.
- [8] MA X, TAO H, YANG K, et al. A functionalized graphene oxide-iron oxide nanocomposite for magnetically targeted drug delivery, photothermal therapy, and magnetic resonance imaging [J]. *Nano Research*, 2012, 5(3): 199-212.
- [9] RANA V K, CHOI M C, KONG J Y, et al. Synthesis and drug-delivery behavior of chitosan-functionalized graphene oxide hybrid nanosheets [J]. *Macromolecular Materials and Engineering*, 2011, 296(2): 131-140.
- [10] LIU Q, GUO B, RAO Z, et al. Strong two-photon-induced fluorescence from photostable, biocompatible nitrogen-doped graphene quantum dots for cellular and deep-tissue imaging [J]. *Nano Letters*, 2013, 13(6): 2436-2441.
- [11] WANG X, SUN X, LAO J, et al. Multifunctional graphene quantum dots for simultaneous targeted cellular imaging and drug delivery [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, 122: 638-644.
- [12] WATE P S, BANERJEE S S, JALOTA-BADHWAR A, et al. Cellular imaging using biocompatible dendrimer-functionalized graphene oxide-based fluorescent probe anchored with magnetic nanoparticles [J]. *Nanotechnology*, 2012, 23(41): 415101.
- [13] LEE W C, LIM C H Y X, SHI H, et al. Origin of enhanced stem cell growth and differentiation on graphene and graphene oxide [J]. *ACS Nano*, 2011, 5(9): 7334-7341.
- [14] YIN P T, SHAH S, CHHOWALLA M, et al. Design, synthesis, and characterization of graphene-nanoparticle hybrid materials for bioapplications [J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(7): 2483-2531.
- [15] KU S H, PARK C B. Myoblast differentiation on graphene oxide [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(8): 2017-2023.
- [16] WANG Z, TONDERYS D, LEGGETT S E, et al. Wrinkled, wavelength-tunable graphene-based surface topographies for directing cell alignment and morphology [J]. *Carbon*, 2016, 97: 14-24.
- [17] ZHANG K, ZHENG H, LIANG S, et al. Aligned PLLA nanofibrous scaffolds coated with graphene oxide for promoting neural cell growth [J]. *Acta Biomaterialia*, 2016, 37: 131-142.
- [18] HEO C, YOO J, LEE S, et al. The control of neural cell-to-cell interactions through non-contact electrical field stimulation using graphene electrodes [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(1): 19-27.
- [19] TUFT B W, ZHANG L, XU L, et al. Material stiffness effects on neurite alignment to photopolymerized micropatterns [J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15(10): 3717.
- [20] SOMMAKIA S, LEE H C, GAIRE J, et al. Materials approaches for modulating neural tissue responses to implanted microelectrodes through mechanical and biochemical means [J]. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 2014, 18(6): 319-328.
- [21] ENGLER A J, SEN S, SWEENEY H L, et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 677-689.
- [22] DALBY M J, GADEGAARD N, TARE R, et al. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder [J]. *Nature Materials*, 2007, 6(12): 997-1003.
- [23] DISCHER D E, JANMEY P, WANG Y. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate [J]. *Science*, 2005, 310(5751): 1139-1143.
- [24] MARCANO D C, KOSYNKIN D V, BERLIN J M, et al. Improved synthesis of graphene oxide [J]. *ACS Nano*, 2010, 4(8): 4806-4814.
- [25] PELHAM R J, WANG Y. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94(25): 13661-13665.
- [26] 邱阳, 陈玉峰, 祖成奎, 等. ITO 薄膜的研究进展[J]. *现代技术陶瓷*, 2016, 37(5): 303-324.
- [27] 邱阳. 电子束蒸发 ITO 薄膜结构、性能及球形基底薄膜制备[D]. 北京: 中国建筑材料科学研究总院, 2015, 73-96.
- [28] 黎明, 温诗铸. 硅的微观硬度测试研究[J]. *机械科学与技术*, 2001, 20(6): 886-887.
- [29] 陈光华, 卢阳华. 不锈钢衬底上沉积类金刚石薄膜的硬度[J]. *无机材料学报*, 1996, 11(4): 639-645.
- [30] LEE C, WEI X, KYSAR J W, et al. Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene [J]. *Science*, 2008, 321(5887): 385-388.

Regulation of Cell Adhesion by Surface Patterning Graphene Oxide on Rigid Substrates

XU Panju, XING Yun, XU Weizhong, Huang Min, LIU Aiping

(a. Department of Physics, b. Center for Optoelectronics Materials and Devices,
Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: The physicochemical properties of biological materials (such as stiffness, roughness and hydrophily) have a huge effect on cell behaviors, including adhesion, proliferation, migration, differentiation and apoptosis. The patterning design of biological materials is one of the effective means for regulating cell life activities. In this study, a graphene oxide (GO) array of relatively regular pattern is obtained by pressure regulation with the method of soft lithography with polydimethylsiloxane as stamp. Under the optimized pressure conditions, the GO array is successfully transferred on the surface of three substrates, namely silicon wafer, diamond-like carbon film and indium tin oxide glass. Effective regulation of selective attachment of nerve cell (PC12) has been realized according to the performance difference between substrate material and GO material. The research results show that, comparing with rigid substrate, hydrophilic GO of low hardness performs better in promoting selective adhesion and proliferation of PC12 nerve cells. The bigger the GO array area is, the larger the density of the cells adhered to the surface is.

Key words: graphene oxide; array material; rigid substrate; cell selective adhesion

(责任编辑:唐志荣)