

基于PDMS的2D、3D体外细胞培养方法进展

杜婉钰^{1,2} 刘佳琳¹ 沙笑羽¹ 李旖蕊¹ 郎明非¹ (通讯作者)

1. 大连大学医学院 辽宁大连 116622

2. 西安大兴医院 陕西西安 710082

摘要:近年来,体外细胞培养技术取得了长足的进展,二维(2D)和三维(3D)细胞培养方案层出不穷。其中,基于聚二甲基硅氧烷(PDMS)的培养方案以其广泛的应用而备受瞩目。PDMS,这种由硅氧分子的重复单元和两个有机甲基附着在硅上构成的合成聚合物,以其卓越的生物兼容性和易于加工的特性,在基于微流控技术的2D细胞培养领域获得了大量应用。而随着器官芯片技术的持续进步,PDMS在器官芯片构建中同样展现出卓越的性能,其在3D细胞培养领域也发挥着举足轻重的作用。本文旨在全面概述基于PDMS的2D和3D体外细胞培养方法,并深入探讨3D细胞培养在器官芯片中的具体应用。

关键词: PDMS; 二维细胞培养; 三维细胞培养; 器官芯片

1 概述

PDMS具有生物相容性、透气性、透明性、易成型、化学惰性以及价格低廉等许多优质特性,可以在 $-50^{\circ}\text{C} \sim 200^{\circ}\text{C}$ 下长期使用,也易于保存。由于PDMS折射率低,仅为1.4,故制备成型的PDMS能够与各种光学成像方法^[1]兼容。因此可以利用场成像技术^[2],实现在不同设备中精确捕捉小分子物质或单细胞的成像,如微流控技术。PDMS作为微流控的底部材料,其高多孔结构能够完成短期和长期细胞培养^[3]。综上在对于细胞间相互作用及细胞与环境间相互作用的研究中,PDMS的应用是不可或缺的。

2 基于PDMS的2D培养方法

2D培养是目前常用的体外细胞培养方法。1885年,德国胚胎学家Wilhelm Roux从鸡胚中分离细胞并建立体外细胞单层培养技术,自此体外2D培养技术飞速发展^[4],是在玻璃或塑料培养瓶中,将含有细胞的培养液加入,该培养方法自20世纪初以来就被应用于研究^[5]。细胞居住的微环境在调节细胞粘附、分化、迁移等各种细胞行为中起着关键作用^[6,7],除了细胞外基质(ECM)的生化信号外^[8,9],细胞培养的底物如机械刚度、表面粗糙度等物理特征也被认为可以影响细胞^[10,11]。因此,这可以被作为改造PDMS 2D培养的依据。

2.1 2D培养中PDMS的表面包被

为了在使用PDMS进行培养的过程中,能够规避原有底物的疏水性,以更好地模仿细胞原有的细胞外基质ECM,

从而改善细胞的粘附、增殖和功能。ECM是由非细胞纤维蛋白、各种结构大分子(辅助蛋白)和粘附分子组成的支架,为细胞提供结构和生化支持,是许多基本过程必不可少的^[12,13]。科研人员也不断的尝试应用各种基质覆盖于PDMS表面。在自然组织中,细胞嵌入在ECM中,如胶原蛋白、纤维连接蛋白和明胶,通常用于覆盖PDMS,为细胞的附着和存活提供一个自然的部分^[14]。

现已开发出将ECM物质与PDMS底物材料配合起来的方法,如纤维连接蛋白和明胶。纤维连接蛋白是结缔组织的主要蛋白,纤维连接蛋白在PDMS上的蛋白质吸附率最高^[15-17],Mohamad^[18]等人使用纤维连接蛋白包被的PDMS微通道培养HSPCs,通过对比在微流控和常规培养中干细胞归巢因子的表达,发现在3D环境中HSPCs保持自我更新潜能,与常规方法相比,微流控系统中CD133+细胞扩增显著升高,微流控系统中CXCR4基因表达上调。shi等人^[19]开发了一种用于抗肿瘤药物测试的仿生双层血管微流控模型,该研究利用猪明胶技术提高了PDMS表面的亲水性同时发现涂有PDMS的通道所培养的细胞存活时间较长。

2.2 PDMS表面形貌改变对2D细胞培养的影响

体外细胞培养是模拟细胞在体内的生长,但细胞在体内并不是生长在光滑表面上,因此,人们利用PDMS的易加工性对PDMS的形貌进行改变以尽可能的模拟体内环境。PDMS作为具有良好生物相容性的细胞底物,研究人员试图

在光滑的 PDMS 表面上开发出不同的功能用以促进细胞培养的新效果。Mojdeh^[20] 等人应用了 SDBD 血浆处理后得到不同粗糙度的表面, 以进一步评价 A549 细胞在这些表面的附着、增殖和形态特征。结果表明: 随着 PDMS 粗糙度的增加, A549 细胞的活力降低。同时, 细胞覆盖率随表面粗糙度的增加而呈下降趋势, 证明了具有粗糙度的底物会导致癌细胞死亡, 这为帮助癌细胞清除提供了强有力的基础。Hadi^[21] 等人研究了通过增加底物的粗糙度可以促进细胞初始活力过程中的蛋白质吸附, 并影响 hAMSCs 的细胞骨架变化, 促进成骨。Morgan M^[22] 设计了一种微粗糙的聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 表面, 整合了 50 mm 宽的纤连蛋白 (FN) 线与 60 mm 宽的牛血清白蛋白 (BSA) 线分离的微模式。与在平坦 PDMS 上培养的细胞相比, 粗糙 PDMS 形貌显著降低了细胞面积, 并诱导几个 ECM 相关基因上调两倍。

综上, 与传统 2D 培养所需的玻璃, 塑料等制品相比, PDMS 因其独特的性质, 可以基于不同实验的需求进行不同的图案形貌定制。同时, 形貌改变的 PDMS 可以更好的模拟体内细胞生长发育的过程。这对传统培养及利用 PDMS 进行的 2D 细胞培养实现了革新。

3 基于 PDMS 的 3D 细胞培养方法

为了克服这些限制, 研究人员目前正在提供和开发新的体外 3D 细胞培养系统^[23]。3D 培养是一种立体培养方式, 将细胞放置于模拟体内环境的 3D 载体内, 细胞会在其离体空间结构中生长, 形成 3D 细胞-载体复合物^[24]。3D 培养系统可以更好地模拟细胞在体内所经历的生理条件和环境, 可以提高我们对细胞行为的理解。与 2D 环境相比, 3D 培养可以更真实体现细胞的生长特性和行为表现, 同时在 3D 培养中培养的细胞, 也展现出不同的形态、粘附、增殖和基因表达。因此, 应用 3D (3D) 细胞培养技术模拟体内的细胞微环境受到极大的重视。目前, 已有大量高分子材料被用于细胞培养, 其中 PDMS 符合了促进细胞粘附且生物相容性良好, 不会在宿主体内引起炎症、中毒等不良反应; 同时 PDMS 具有一定的机械强度和可塑性, 可以为细胞的生长提供其所需的 3D 结构和机械性能, 有合适的孔径, 可以运输细胞所需的一些营养物质。近年来, 研究主要围绕着基于微流控芯片的 3D 细胞培养和基于支架结构的细胞培养等。

3.1 3D 细胞培养中的 PDMS 支架结构

在 3D 培养的过程中通常会借助组织材料将细胞嵌在材

料上或包埋在材料内部, 来模拟更加真实的体内环境。支架结构是一种内部具有相连孔径、可为细胞提供力学支撑的结构, 可以根据需要对支架的成分、结构进行定制^[25, 26]。PDMS 因其独特的性质, 同时已有多种研究证明了各种细胞外机制可以与 PDMS 结合或覆盖, 以提供与细胞外基质相似的结构与功能, 可以更好地模拟细胞体内生长的物理和空间结构, 长期以来一直是生物材料和生物医学领域研究的重点方向之一。

3D 细胞培养模拟体内细胞培养环境的方法是通过建立支架将细胞嵌入。Zargar R^[27] 等将气体发泡与颗粒浸出结合起来, 以碳酸氢钠发泡盐, 氯化钠为引发剂, 形成具有海绵结构的 3D PDMS。该团队将内皮细胞培养于改造后的 PDMS 上, 内皮细胞的生长活力显著增加, 细胞生长状态更加接近于体内生长环境。Moghadas^[28] 等通过修饰 PDMS 与聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA) 作为载体聚合物的比值, 改进了能够进行 3D 细胞培养的电纺 PDMS 膜/支架, 结果表明: 上皮性肺癌细胞能在此支架上成功培养, 同时发现在培养过程中, 产生了更加接近体内条件的多细胞球状体, 这可以为肿瘤发生的多个方面提供有价值的见解。同时可以有效地替代其他昂贵的 2D 细胞培养平台。陈津^[29] 等人使用 PDMS 和氯化钠晶体来构建 3D 支架, 同时结合胰岛、纤维蛋白以及骨髓间充质细胞 (MSCs), 共同构建迷你“人工胰腺”, 然后将其应用于糖尿病大鼠移植模型中, 大鼠的血糖可以一定程度的得到控制, 说明其构建的“人工胰腺”成功, 因其具有相应的生物学功能。何懿^[30] 等使用 PDMS 做为微孔支架材料, 对表面进行加工, 生成 40 μm、60 μm 和 80 μm 等不同孔径的微阵列, 并在其上接种大鼠脂肪干细胞 RADSCs 单细胞。结果显示, 大鼠脂肪干细胞在 PDMS 表面以及微孔内爬附生长, 其结构表现“伪足”样及“桥”样, 内部的 F-actin 纤维排列方向与以上结构长轴平行。同时, 钮慧^[31] 等人发现与传统 2D 细胞培养环境下的细胞相比, 肿瘤细胞在 EDC 交联 SF/CS 3D 细胞培养支架中对低剂量化疗药物的敏感性更高。

3.2 基于微流控芯片的 3D 细胞培养

3D 细胞培养的微流控芯片设计已成为当前的研究热门, 微流控技术的进步通过以下显著特征^[32-34] 加快了 3D 细胞培养或组织模型的发展速度。1. 微流控平台的微尺度尺寸适用于创建具有高复杂性和空间异质性的体内组织的生物微环

境。此外,微流控通道的物理结构可以提供一个受良好控制的流体动力环境,如化学梯度或流体流^[35,36]。2.由于系统规模小,在实验中只需要少量的细胞和试剂,随着从生物分析到药物开发的研究进展,这降低了成本。3.微流控技术可以整合生物分析的多个后续步骤,从培养和液体处理到检测和分析。Mei^[37]等人为探讨在乳腺癌骨转移机械调控中骨细胞起到的作用,利用PDMS开发了一种新型的体外微流控组织模型,实验结果证明机械刺激的骨细胞可以减少乳腺癌外渗,同时这也是第一个在微流控装置上整合刺激性骨液流的成功案例。J. Rosser^[38]设计了一种基于PDMS微流控3D软骨细胞培养平台用于模拟体内关节软骨细胞的形态、细胞分布、代谢和基因表达。Schepers^[39]等人利用患者的人类诱导多能干细胞开发了一种肝脏芯片。该细胞使用可灌注系统作为3D类器官培养。田曦亮等^[40]将微流控芯片筛选出的骨髓间充质干细胞继续在可以对细胞产生化学刺激且具备生成连续梯度能力的微流控芯片中进行培养,诱导出的类雪旺细胞促轴突再生的能力与正常的雪旺细胞非常接近;Jung^[41]等人利用PDMS设计和制造了模拟子宫内环境组成的上皮、间质和血管三层微流控装置,证明了其对促血管生成因子和激素刺激的适当反应性。综上,通过基于PDMS的微流控芯片进行3D培养,可以更贴近细胞在体内的生长发育过程。

4 基于PDMS的3D细胞培养在器官芯片中的应用

器官芯片的构建和其功能的实现离不开基础材料,常用材料包括但不限于聚二甲基硅氧烷(PDMS)、硅、玻璃、有机玻璃(即聚甲基丙烯酸甲酯,PMMA)等。PDMS在众多材料中最为常见,通常通过修饰PDMS表面来增进细胞的附着和生长。制备器官芯片的另一种方式是与其他材料结合,在PDMS上加工出微流道结构并将其覆盖在玻璃片上,PDMS材料只需提供流体通过所需的微流道结构,而细胞会附着于玻璃表面上生长,以此来规避PDMS材料的生物兼容性问题。PDMS材料的又一不足之处在于对小分子材料的吸收率较高,因此在使用PDMS材料的器官芯片进行药物筛选时,要留意其吸收问题^[42]。

在生理学研究,与药物筛选相比,器官芯片的不同之处在于需要构建正常生理状态的微组织模型。器官芯片可以被认为成是在微流控芯片上制备的人类器官的缩小版模型。科学家们通过器官芯片这项技术,已经利用正常的体细胞如

肺、肝、肠、乳腺等构建了多种相关的类器官^[43-45]。最近,器官芯片技术已经能够集成多个器官或组织模型模拟人体,和多器官系统生成使用干细胞开发人体芯片系统,这样一个系统可以提供一个预测模型的药物药动力学通过模仿人体的活动如吸收、分布、代谢和消除药物。Kim等^[46]使用3D微流控技术构建的人体肝器官芯片,探究在乳腺癌细胞转移过程中胞外囊泡起到的作用,结果显示乳腺癌细胞的转移明显倾向于肝脏而非肾脏^[47]。Ingber课题组^[48]设计的肠芯片与上文提及的肺芯片结构类似,它包含两条微流体通道以及一个多孔PDMS膜,膜上覆盖有人肠上皮细胞和细胞外基质。另有两个真空室位于微流体通道外侧,通过调节中控室的压强,可以对PDMS薄膜施加拉力和压力,以此来模拟肠道的蠕动运动。该芯片可用于肠道微生物和肠上皮细胞的体外共培养,来模拟肠的动态生理学功能与特征。

器官芯片作为一种研究手段,也可以与基因编辑、单细胞测序等众多前沿实验技术相结合,从分子层面、细胞层面以及器官层面多维度探索生命活动新的认识。在临床治疗过程中,患者面对器官移植时,往往存在供体短缺和免疫排斥的问题,若可以成功将患者自有的干细胞在体外进行培育,使其形成类器官再植入患者体内,这将成为应对上述问题的关键策略。

5 展望

PDMS因其独特的化学物理特性,在细胞培养中占据了主导地位,同时也承担着生物医学实验、组织工程学实验的重要任务。目前已经研发出使用不同方法在光滑的PDMS表面进行改造或添加,以解决传统2D细胞培养中所面临的问题的技术手段,但要想长期进行细胞体外培养实验,2D细胞培养技术仍然有许多不足,因此利用PDMS来进行3D培养,是更加有效和可行的方式,然而,尽管3D培养技术拥有多种明显优势,它仍需应对不断涌现的新功能开发需求和多项挑战。与此同时,类器官技术的发展已经越来越受到学者的重视,这一技术在多个领域展现了其潜力,如基础生物学研究、疾病模型构建、癌症研究、组织再生、药物筛选等。多种以细胞或组织为基础类器官模型相继涌现,这为优质材料PDMS在其中发挥作用提供了平台,值得进行更深入的研究。

参考文献:

[1]M, T. & S, T. – Viable cell culture in PDMS-based micro-

fluidic devices[J]. *Methods Cell Biol* ,2018148:3–33.

[2]O, O. et al. – Real-time deformability cytometry: on-the-fly cell mechanical phenotyping[J]. *Nat Methods*,2015 12:199–202.

[3]M, D. et al. – Surface Modification of PDMS-Based Microfluidic Devices with Collagen Using[J]. *Micromachines* ,2021,12.

[4]王建政,朱玉霞.细胞培养中的三维支架[J].*生物骨科材料与临床研究* ,2016,13: 60–64+72 .

[5]LP, F., VM, G. & JF, M. – Design of spherically structured 3D in vitro tumor models –Advances and[J].*Acta Biomater* ,2018,75:11–34.

[6]EC, C. et al. – 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their[J].*Biotechnol Adv* ,2016,34: 1427–1441

[7]LD, A., A, H., G, K., MJ, M. & SJ, B. – Enzymatically degradable poly(ethylene glycol) hydrogels for the 3D culture and[J]. *Acta Biomater* ,2015,22:103–110.

[8]I, M.–S. et al. – Surface characteristics determining the cell compatibility of ionically[J]. *Biomed Mater*,2014, 9:1748–6041

[9]T, N. & E, T. – The effect of cerium valence states at cerium oxide nanoparticle surfaces on cell[J]. *Biomaterials*,2014, 35:4441–4453.

[10]AM, R., Z, J., M, B. & J, L. – Physical aspects of cell culture substrates: topography, roughness, and[J]. *Small*,2012, 8:336–355 .

[11]Huttlin, E.L. et al. Dual proteome-scale networks reveal cell-specific remodeling of the human interactome[J]. *Biomaterials*,2019.

[12]LA, S., LH, C., KL, W., KH, L. & AM, K. – Isolation and Identification of Proteins Secreted by Cells Cultured within[J]. *ACS Biomater Sci Eng*,2018,4: 836–845.

[13]R, M., PI, L. & E, C. – Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in. *Trends Biotechnol* ,2015,33: 230–236 .

[14]A, S., T, M., RW, S. & S, N. – Improved cell adhesion under shear stress in PDMS microfluidic devices[J]. *Colloids Surf*

B Biointerfaces ,2017150:456–464.

[15]M, L. et al. – Adsorption force of fibronectin on various surface chemistries and its vital role[J]. *Biomacromolecules* ,2018,16:973–984.

[16]CG, C. et al. – Fibronectin coating of oxygenator membranes enhances endothelial cell attachment. *Biomed Eng Online*,2013, 12: 12–17.

[17]P, S., PY, C., C, B., CF, C. & E, G. – Microfluidic devices for the study of actin cytoskeleton in constricted. *Methods*,2016, 94:65–74.

[18]MH, M., A, H., M, A., M, R. & M, S. – Expansion of cord blood stem cells in fibronectin-coated microfluidic bioreactor[J]. *Hematol Transfus Cell Ther* ,2021,10 (20).

[19]W, S. et al. – Bi-layer blood vessel mimicking microfluidic platform for antitumor drug[J].*Biomicrofluidics*,2019, 13 (9).

[20]Mohseni, M. et al. Differential Attachment of Pulmonary Cells on PDMS Substrate with Varied Features[J]. *Hematol Transfus Cell Ther* ,2020.

[21]Hashemzadeh, H.A.–O. et al. PDMS Nano-Modified Scaffolds for Improvement of Stem Cells Proliferation and Differentiation in Microfluidic Platform[J]. *LID*,2016.

[22]Stanton, M.M. et al. Cell behavior on surface modified polydimethylsiloxane (PDMS)[J]. *Hematol Transfus Cell Ther* ,2019.

[23]CM, M., C, B. & RM, O. – Advances in Engineering Human Tissue Models[J].*Front Bioeng Biotechnol*,2021, 8 (21).

[24]D, A., H, B., E, J. & G, N. – Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo[J]. *Int J Mol Sci* ,2015,16:5517–5527.

[25]J, X. et al. – Construction of the recellularized corneal stroma using porous acellular corneal[J].*Biomaterials* ,2021,32:6962–6971.

[26]SW, C., YC, Y., Y, Z., HW, S. & Y, X. – Uniform beads with controllable pore sizes for biomedical applications[J]. *Small*,2010, 6:1492–1498.

[27]B, Z. et al. – Functionalized PDMS with Versatile and Scalable Surface Roughness Gradients for[J].*ACS Appl Mater Interfaces* ,2015,7:17181–1718.

[28]Moghadas, H., Saidi, M.S., Kashaninejad, N.,

Kiyomarsioskouei, A. & Nguyen, N.T. Fabrication and characterization of low-cost, bead-free, durable and hydrophobic electrospun membrane for 3D cell culture[J]. *Biomedical microdevices* ,2017,19:74

[29] 陈津. 骨髓间充质细胞联合 PDMS 支架构建移植胰岛微环境的实验研究 [J]. *中华细胞与干细胞杂志 (电子版)*,2018,8:328-333.

[30] 何懿. 骨髓间充质细胞联合 PDMS 支架构建移植胰岛微环境的实验研究 [D]. 北京:北京协和医学院, 2011.

[31] 钮慧. 骨髓间充质细胞联合 PDMS 支架构建移植胰岛微环境的实验研究 [D]. 苏州:苏州大学, 2018.

[32] Li, X.J., Valadez Av Fau – Zuo, P., Zuo P Fau – Nie, Z. & Nie, Z. Microfluidic 3D cell culture: potential application for tissue-based bioassays[J]. *Biomedical microdevices* ,2017.

[33] Ren, K., Zhou J Fau – Wu, H. & Wu, H. Materials for microfluidic chip fabrication[J]. *ACS Appl Mater Interfaces* ,2015.

[34] Ertl, P., Sticker, D., Charwat, V., Kasper, C. & Lepperdinger, G. Lab-on-a-chip technologies for stem cell analysis.

[35] Mahadik, B.P., Wheeler Td Fau – Skertich, L.J., Skertich Lj Fau – Kenis, P.J.A., Kenis Pj Fau – Harley, B.A.C. & Harley, B.A. Microfluidic generation of gradient hydrogels to modulate hematopoietic stem cell culture environment[J]. *ACS Appl Mater Interfaces* ,2015.

[36] Choi, N.W. et al. Microfluidic scaffolds for tissue engineering[J]. *Human reproduction (Oxford, England)*,2019.

[37] Mei, X. et al. Microfluidic platform for studying osteocyte mechanoregulation of breast cancer bone metastasis[J]. *ACS Appl Mater Interfaces* ,2015.

[38] Rosser, J. et al. Microfluidic nutrient gradient-based three-dimensional chondrocyte culture-on-a-chip as an in vitro equine arthritis model[J]. *Human reproduction (Oxford, England)*,2019.

[39] Schepers, A., Li, C., Chhabra, A., Seney, B.T. & Bhatia, S. Engineering a perfusable 3D human liver platform from iPSCs[J]. *ACS Appl Mater Interfaces* ,2015.

[40] 田曦亮. 细胞培养中的三维支架 [J]. *生物骨科材料与临床研究* ,2013.

[41] Ahn, J. et al. Three-dimensional microengineered vascularised endometrium-on-a-chip[J]. *Human reproduction (Oxford, England)* ,2021,36: 2720-2731.

[42] Shirure, V.S. & George, S.C. Design considerations to minimize the impact of drug absorption in polymer-based organ-on-a-chip platforms[J]. *Lab on a chip*,2017, 17: 681-690.

[43] Rosenbluth, J.M. et al. Organoid cultures from normal and cancer-prone human breast tissues preserve complex epithelial lineages[J]. *Nature communications*,2020, 11:1711.

[44] Rothbauer, M. et al. Monitoring tissue-level remodelling during inflammatory arthritis using a three-dimensional synovium-on-a-chip with non-invasive light scattering biosensing[J]. *Lab on a chip* ,2020,20:1461-1471.

[45] Barkauskas, C.E. et al. Lung organoids: current uses and future promise[J]. *Development (Cambridge, England)* ,2017,144:986-997.

[46] Kim, J. et al. Three-Dimensional Human Liver-Chip Emulating Premetastatic Niche Formation by Breast Cancer-Derived Extracellular Vesicles[J]. *ACS nano* ,2020,14:14971-14988.

[47] Tian, H. et al. A Novel Tissue-Based Liver-Kidney-on-a-Chip Can Mimic Liver Tropism of Extracellular Vesicles Derived from Breast Cancer Cells[J]. *Biotechnology journal*,2020, 15.:1900107.

[48] Kim, H.J., Huh, D., Hamilton, G. & Ingber, D.E. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow[J]. *Lab on a chip*,2012,12:2165-2174.

作者简介:

杜婉钰(1999—),女,汉族,河南濮阳人,硕士研究生,西安大兴医院,初级职称,肿瘤细胞周期。刘佳琳(1998—),女,汉族,河北保定人,硕士研究生,大连大学,肿瘤治疗。沙笑羽(2004—),女,汉族,黑龙江大庆人,学士,大连大学中山临床学院,肿瘤治疗。李漪蕊(2004—),女,汉族,内蒙古包头人,学士,大连大学,肿瘤治疗。通讯作者:郎明非(1972—),男,汉族,辽宁大连人,博士,大连大学,教授,肿瘤治疗。