

聚乳酸微柱阵列型拓扑结构基底上 SH-SY5Y 细胞 VEGF 和 IL-8 的分泌及表达

范志刚, 林雨, 黄岂平, 罗美蓉, 田青华, 钟冬火, 冯全义, 吴泽志

重庆大学生物工程学院 生物流变科学与技术教育部重点实验室, 重庆 400044

范志刚, 林雨, 黄岂平, 等. 聚乳酸微柱阵列型拓扑结构基底上 SH-SY5Y 细胞 VEGF 和 IL-8 的分泌及表达. 生物工程学报, 2013, 29(11): 1629–1643.

Fan ZG, Lin Y, Huang QP, et al. Secretion and expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-8 by SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Chin J Biotech, 2013, 29(11): 1629–1643.

摘 要: 以紫外光光刻、硅蚀刻及复制模塑技术制备了聚乳酸 (PLLA) 微柱阵列型拓扑结构基底, 考察了 SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞在拓扑结构基底上的生长及血管内皮生长因子 (VEGF) 和白细胞介素-8 (IL-8) 的分泌及表达。细胞的形态及铺展采用扫描电子显微图像进行分析, 细胞在拓扑结构基底上生长 24 h 后的 VEGF 及 IL-8 分泌量采用 ELISA 进行检测, VEGF 及 IL-8 在 mRNA 水平的表达量以实时定量 PCR 进行评价。实验中成功制备了微柱名义直径为 2 μm 和 4 μm 、微柱名义间距为 2 μm 和 7 μm 的 4 种拓扑结构基底。研究发现, SH-SY5Y 细胞在 2-2 μm (微柱名义直径-名义间距)、4-2 μm 、4-7 μm 拓扑结构基底上的 VEGF 和/或 IL-8 分泌量和表达较之 PLLA 平面基底上相应值出现上调, 而在 2-7 μm 拓扑结构基底上 VEGF 及 IL-8 二者均表现出表达和分泌大幅度明显的上调。与在 PLLA 平面基底上相比, SH-SY5Y 细胞在拓扑结构基底上表现出细胞形态 (铺展面积及圆度) 的明显变化, 细胞 VEGF 及 IL-8 分泌量和表达的上调伴随细胞铺展面积的明显降低。结果表明微柱阵列型拓扑结构是影响 SH-SY5Y 细胞 VEGF、IL-8 分泌及表达的重要微环境因素, VEGF 和 IL-8 可能构成 SH-SY5Y 细胞在拓扑结构基底上生长的重要分泌物标志。

关键词: 复制模塑, ELISA, 实时定量 PCR, 人神经母细胞瘤细胞, 分泌物标志

Received: December 17, 2012; **Accepted:** April 1, 2013

Supported by: Research Foundation for Doctoral Programs in Universities under the State Ministry of Education of China (No. 20100191110032), Foundation for Sci & Tech Research Project of Chongqing (No. CSTC2009AB5202), National Natural Science Foundation of China (No. 30870570), the 111 Project of the State Ministry of Education of China (No. B0623), Sharing Fund of Chongqing University's Large-scale Equipment (No. 2011121535).

Corresponding author: Zezhi Wu. Tel: +23-65102507; E-mail: zzwu@cqu.edu.cn

高等学校博士学科点专项科研基金资助课题 (No. 20100191110032), 重庆市科技攻关重点项目 (No. CSTC2009AB5202), 国家自然科学基金 (No. 30870570), 教育部国家外专局生物力学与组织修复学科创新引智基地 (111 计划) (No. B0623), 重庆大学大型仪器设备开放基金 (No. 2011121535) 资助。

网络出版时间: 2013-07-10

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130710.1617.002.html>

Secretion and expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-8 by SH-SY5Y human neuroblastoma cells

Zhigang Fan, Yu Lin, Qiping Huang, Meirong Luo, Qinghua Tian, Donghuo Zhong, Quanyi Feng, and Zezhi Wu

Key Laboratory of Biorheological Science and Technology of the State Ministry of Education, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China

Abstract: To establish vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukin-8 (IL-8) as secretory biomarkers for cell growth on topographic substrates, we have evaluated the secretion and expression of these 2 factors by SH-SY5Y human neuroblastoma cells on poly-L-lactide (PLLA) micropillar arrayed topographic substrates. We fabricated topographic substrates with UV lithography, silicon etching and polydimethylsiloxane-based replica molding, and interfaced SH-SY5Y human neuroblastoma cells with both the topographic substrates and PLLA flat substrates. Cell morphology and spreading were examined with scanning electron microscopy. The secretion and mRNA expression of VEGF and IL-8 were evaluated with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and real time qPCR, respectively, 24 hours after cell plating. We successfully achieved 4 topographic substrates with a nominal pillar diameter of 2 μm and 4 μm , and a nominal pillar spacing of 2 μm and 7 μm . We found that the secretion and mRNA expression of VEGF and/or IL-8 by SH-SY5Y cells on 2-2 μm (pillar diameter-spacing), 4-2 μm and 4-7 μm topographic substrates were upregulated in comparison to those by cells on PLLA flat substrate, 24 hours after cell plating. Furthermore, both cytokines were even more substantially upregulated on the 2-7 μm substrate than on the other 3 topographic substrates. Compared to those on PLLA flat substrate, cells on topographic substrates showed significant changes in morphology (spreading area, perimeter and roundness), and the increase in the secretion and mRNA expression of VEGF and IL-8 was accompanied with a decrease in cell spreading areas. These results provided evidence that pillar arrayed topography was an important microenvironmental factor in affecting VEGF and IL-8 expression or secretion, and VEGF and IL-8 might serve as important secretory biomarkers for growth on topographic substrates by SH-SY5Y cells.

Keywords: replica molding, ELISA, RT-PCR, SH-SY5Y cell, secretory biomarker

拓扑结构是体内基质环境及体外细胞培养基底中影响组织结构以及细胞的形态和功能最重要的物理因素之一^[1-4]。早在 1912 年, Harrison 等以蜘蛛网进行的细胞培养实验即发现细胞会沿着培养基底的拓扑结构进行排列、形态取向和迁移, 此即后来被称为的“接触引导”(Contact guidance)^[5]。近一个世纪的研究已经证实了拓扑结构对细胞的接触引导是众多细胞类型的共同培养特征^[6], 揭示了基底拓扑结构设计在体外细

胞培养相关领域的重要应用前景。近十余年来, 微加工技术领域新方法的出现及原有制备方法的改进使得在众多材料上制备出微米和亚微米级拓扑结构成为可能, 这些为有关领域深入研究拓扑基底条件下培养细胞的形态结构响应乃至功能分化提供了条件。近年随着细胞工程及细胞芯片相关领域的进展, 细胞与拓扑结构基底相互作用的研究已经越来越多地注重拓扑结构基底上细胞的功能响应性及功能分化^[7-10]。拓扑结构

基底上细胞功能响应性及功能分化的研究是基底拓扑结构设计在体外细胞规模化培养、组织工程、细胞芯片和细胞微系统构建以及仿生工程中应用研究的前提。

对于神经细胞,三维及拓扑结构培养基底已经被成功地应用于神经细胞培养,引导神经细胞的形态分化及突起延伸等^[11]。近年的研究更进一步发现,三维及拓扑结构条件下神经细胞的离子通道,如电压依从式钙离子通道 (Voltage-gated calcium channels, VGCCs),较之二维平面基底时表现出不同的功能响应性^[12-14]。采用一种微球致密阵列拓扑结构基底的研究表明,拓扑结构基底在特定的结构条件下可以促进神经细胞形态铺展并进而增强 VGCCs 功能响应性^[12]。与此相反,在三维微小凹图式上神经细胞较之二维平面基底上铺展程度减小,其 VGCCs 功能响应性却明显降低^[13-14]。这些发现促使人们寻找细胞于三维及拓扑结构培养条件下的标志分子,尤其是分泌物标志,及其与细胞功能表型的关系。建立神经细胞在三维及拓扑结构培养条件下的分泌物标志的意义是,分泌物标志提供了细胞在三维或拓扑结构基底上特定生长状态的简易、快速而实用的评价手段。

细胞因子是可溶性低分子量蛋白质,对细胞生长、分化、凋亡以及组织或植入体新生血管形成等有广泛的调节作用。在神经细胞,细胞因子对神经细胞增殖及分化的调控已经得到确认,其分泌和表达是神经细胞生长与功能分化的重要标志,因而也是神经细胞在三维及拓扑结构条件下分泌物标志的理想选择。血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 和白细胞介素-8 (IL-8) 是调节神经细胞功能分化尤

其是离子通道功能表达的重要细胞因子。使用三维组织工程支架材料进行细胞培养,可以发现若干种细胞的 VEGF 和 IL-8 表达较之于二维条件出现上调^[15]。Kisaalita 等采用三维聚苯乙烯支架材料培养人神经干细胞 H945RB.3,发现三维条件下神经干细胞的 VEGF 和 IL-8 mRNA 表达水平显著高于二维条件下的相应值^[16]。类似的研究结果也见于 RGD-藻酸盐三维体系培养的肿瘤细胞^[17]。上述分析表明 VEGF 和 IL-8 分泌及表达的上调可能是神经细胞于三维及拓扑结构条件生长和功能分化的分泌物标志。

本文采用紫外光光刻、硅蚀刻及复制模塑技术,加工了微柱名义直径为 2 μm 和 4 μm 、微柱名义间距为 2 μm 和 7 μm 的 4 种聚乳酸 (Poly-L-lactide, PLLA) 微柱阵列型拓扑结构基底,在此基础上实现了 SH-SY5Y 细胞在阵列型拓扑结构基底上的复合培养。作者进一步评价了在拓扑结构基底上培养细胞的形态学特征以及 VEGF 和 IL-8 的分泌及表达行为,发现 SH-SY5Y 细胞在 PLLA 拓扑结构基底上的 VEGF 和/或 IL-8 表达和分泌量相比平面结构的相应值出现上调,且这一表达和分泌量的上调伴随细胞铺展面积的明显降低。上述结果表明微柱阵列型拓扑结构是影响 SH-SY5Y 细胞 VEGF 和 IL-8 分泌及表达的重要微环境因素,VEGF 和 IL-8 有可能作为 SH-SY5Y 细胞在拓扑结构或三维微环境生长的重要分泌物标志。

1 材料与方法

1.1 PLLA 微柱阵列型拓扑结构基底的制备

PLLA 微柱阵列型拓扑结构基底的制备过程包括光掩模的设计及加工、紫外光光刻、硅蚀刻、

以聚二甲基硅氧烷[Polydimethylsiloxane, PDMS (Sylgard 184, Dow Corning, 美国)]为基础的复制模塑加工等过程。主模采用 P<100>硅片 (电阻率 7-13, 北京有研半导体材料股份有限公司) 进行加工, PDMS 负模的加工及复制模塑在本实验室进行。

研究中设计的拓扑结构基底由圆形微柱阵列构成, 微柱名义直径为 2 μm 和 4 μm , 名义高度 4 μm , 名义间距分别为 2 μm 和 7 μm 。在后文的叙述中将采用微柱名义直径-微柱名义间距 (μm) 描述拓扑结构基底, 如 2-2 μm 拓扑结构基底。PDMS 负模的制备参见前期 PDMS 微柱阵列型拓扑结构基底的制备方法^[12]。将适量 PLLA (相对分子量 100 000, 济南岱罡生物科技有限公司) 置于边长为 12 mm 的方形盖玻片上, 以加热板 (HP7, IKA, 德国, 广州仪科实验室技术有限公司) 加热至 130 $^{\circ}\text{C}$ 使 PLLA 呈熔融状态, 将 PLLA 在盖玻片上涂布均匀。将 PDMS 负模放置于 PLLA 上, 以 0.5 MPa 的压力施压 5 s, 熔融状态的 PLLA 将依靠虹吸作用渗入 PDMS 的微结构间隙, 室温冷却 1 min 后, 在酒精中浸泡 1 min, 剥离 PDMS 负模, 即得 PLLA 微柱阵列型拓扑结构基底。PLLA 二维平面基底的制备采用上述同样方法, 但以平整硅片代替主模分别制备 PDMS 平面基底和 PLLA 二维平面基底^[18]。制备的 PLLA 拓扑结构基底及 PLLA 二维平面基底经紫外光照射 1 h 灭菌, 再以小牛血清裱衬 1 h 待用。

1.2 SH-SY5Y 细胞的培养

SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞购买于 American Type Culture Collection, 以 35 cm^2 培养

瓶 (Corning, 美国) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的条件下常规培养。完全培养基由 DMEM 高糖培养基 (Hyclone, 美国) 添加 10% 热灭活胎牛血清 (GIBCO, 美国)、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 硫酸链霉素 (Sigma, 美国) 构成。当细胞生长到 75% 的融合度时, 采用浓度 0.25% 的胰蛋白酶 (Hyclone, 美国) 消化并以机械吹打法收集细胞, 以完全培养基制备细胞悬浮液。将上述 PLLA 拓扑结构基底及 PLLA 二维平面结构置放入 35 mm^2 的平面培养皿 (FALCON, 美国) 中。将约 0.2 mL 细胞悬液接种于放置于平面培养皿中的 PLLA 微柱阵列型拓扑结构基底或 PLLA 平面二维结构上, 细胞接种密度约 1×10^4 个/mL。样本静置 1 h 后补充加入完全培养基 1 mL, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的条件下常规培养。

1.3 扫描电子显微镜制样及观察

PLLA 微柱阵列型拓扑结构基底及培养的细胞经 PBS 洗涤 3 次, 以 2.5% 戊二醛 (pH 7.2~7.4) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜, 再用 0.9% 的生理盐水洗涤 2 次, 每次 5 min。分别使用 30%、50%、70%、80%、95% 和 100% (2 次) 的乙醇进行梯度脱水, 每步 5 min。样品进一步使用 50%、70%、90%、95% 和 100% (2 次) 的叔丁醇进行梯度脱水, 每步 5 min。样本经自然干燥后, 溅射涂膜镀金 3~5 次, 每次 20 s。扫描电镜照片的拍摄采用扫描电子显微镜 (HITACHI S-3400N, 日本) 进行, 加速电压设置为 15 kV。

扫描电镜照片中细胞形态铺展的评价采用 Image J 软件进行测量。周长及投影面积的测量依据所描绘的包括细胞胞体和片足的轮廓。细胞圆度 = $4 \times \pi \times \text{投影面积} / (\text{周长})^2$ 。

1.4 细胞骨架免疫荧光染色

实验中以鬼笔环肽 (Phalloidin) 进行微柱阵列型拓扑结构基底及二维平面基底上细胞肌动蛋白微丝的免疫荧光染色。SH-SY5Y 细胞接种于微柱阵列型拓扑结构基底及二维平面基底 24 h 后, 依次使用 4% 多聚甲醛固定 40 min, 0.5% Triton X-100 破膜 5 min, 再使用 1% 山羊血清蛋白室温条件下封闭细胞 1 h。样品经用浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 FITC-phalloidin (Sigma, 美国) 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 染色过夜。样品进一步采用浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色液 (碧云天生物技术研究所, 江苏) 进行细胞核染色 15 min。上述染色步骤间细胞均以 PBS 清洗 3 遍, 每次 5 min。封片后用激光共聚焦扫描显微镜 (Leica Sp5, 德国) 进行观察并拍照。鬼笔环肽以 488 nm 的 Argon 激光激发, 以 TD 488/543/633 nm 的长通滤片收集发射光; DAPI 以 405 nm 的 Diode 激光激发, 以基础长通滤片收集发射光。

1.5 酶联免疫吸附反应 (ELISA)

SH-SY5Y 细胞接种于微柱阵列型拓扑结构基底及二维平面基底后, 置于 12 孔板中常规培养 24 h 后, 更换无血清培养液。细胞经无血清培养 24 h 后收集培养液, 以新鲜培养液作为阴性对照进行 ELISA 实验检测 VEGF、IL-8 的分泌量。ELISA 试剂盒购于北京四正柏公司, 按供货商提供的方法常规操作, 用自动酶标仪分析仪 (Model 680, Bio-Rad, 美国) 读取吸光值, 以此进行标定并计算培养液中 VEGF 和 IL-8 浓度及分泌量。拓扑结构基底及二维平面基底上的培养细胞用 0.25% 胰酶消化并分散后, 用四甲基氮唑

蓝 (Methylthiazolyl tetrazolium, MTT) 法 (凯基生物科技发展有限公司, 南京, 中国) 检测细胞数量, 以此进行细胞分泌量的归一化处理及统计分析。

1.6 实时荧光定量 PCR

SH-SY5Y 细胞在微柱阵列型拓扑结构基底及二维平面基底上培养 24 h 后, 使用 Trizol 法提取细胞总 RNA (Bioteke, 中国), 以 2 μg RNA 为模板, 采用 PrimeScriptTM RT reagent kit (TaKaRa, 日本) 反转录试剂盒并参照生产商提供方法合成 cDNA。采用 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法, 以 GAPDH 为内参照, VEGF 与 IL-8 为目的基因。引物序列见表 1。在实时定量 PCR 仪 (Bio-Rad CFX96, 美国) 进行荧光定量 PCR 扩增反应。反应体系为: 2 \times SYBR Premix Ex Taq Mix (TaKaRa, 日本) 10 μL , cDNA 模板 1 μL , 上下游引物各 1 μL , dH₂O 7 μL 。反应参数为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 39 个循环。每个样本均进行 3 次生物学样本重复, 使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行计算分析。

1.7 数据分析

不同基底上细胞投影面积、细胞周长、细胞

表 1 VEGF、IL-8 及内参基因 GAPDH 的 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence for VEGF, IL-8 and GAPDH

Primer name	Primer sequence (5'-3')
VEGF	GCTTGCCATTCCCCACTTGAATC TCTCTTCCTCGACTTCTCTCTGG
IL-8	GAACGTAGAGTGATTGAGAGTGGA CTCTTCAAAAACCTTCTCCACAACC
GAPDH	TCAACGACCACTTTGTCAAGCTCA GCTGGTGGTCCAGGGGTCTTACT

圆度, 细胞 VEGF 和 IL-8 分泌及表达量等结果采用 $\bar{x} \pm s$ (算术平均值 \pm 标准偏差) 表示。组间数据比较采用 Student's *t*-test, 以 $P < 0.05$ 作为统计学差异显著性的判断标准。

2 结果

2.1 SH-SY5Y 细胞与 PLLA 微柱阵列型拓扑结构基底的复合

图 1 为 SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞接种于 2-2 μm 、2-7 μm 拓扑结构基底上生长 12 h 后的相差显微图片。图 2 是 SH-SY5Y 细胞在 4 种 PLLA 微柱阵列型拓扑结构基底和 PLLA 平面基底培养 24 h 后的扫描电子显微图片及相差显微图片。从图 1 和图 2 中可见, 在实验条件下使用紫外光光刻、硅蚀刻和复制模塑技术能够制备结构规整、清晰的微柱阵列型拓扑基底, 且各结构尺寸均符合预期设计要求。相差显微图片显示, 在 2-7 μm 拓扑结构基底上出现少量微柱结构的

断裂缺失 (图 1B)。这一现象可能是在复制模塑制备小微柱时由于负模剥离所致。在进行扫描电子显微制样后, 由于 2-2 μm 基底和 2-7 μm 基底微柱直径较小, 可以发现非细胞粘附区微柱有很大程度断裂缺失, 其中 2-2 μm 拓扑结构基底非细胞粘附区微柱几乎完全断裂或缺失, 2-7 μm 拓扑结构基底非细胞粘附区微柱部分断裂或缺失。这一现象可能是由电镜制样引起的结构熔融或断裂所致。

从图 1 和图 2 中可见, 本文制备的 4 种 PLLA 拓扑结构基底和 PLLA 二维平面基底均可支持 SH-SY5Y 细胞的正常粘附生长。在培养 24 h 后不同基底上的细胞表现出不同的生长形态: 在 2-2 μm 、4-2 μm 拓扑结构基底上细胞形态与平面基底上细胞形态相似, 表现为正常梭形或星形; 在 2-7 μm 拓扑结构基底上细胞表现出较高的极化及形态分化趋势, 部分细胞出现长的神经突起; 在 4-7 μm 拓扑结构基底上细胞形态却趋向

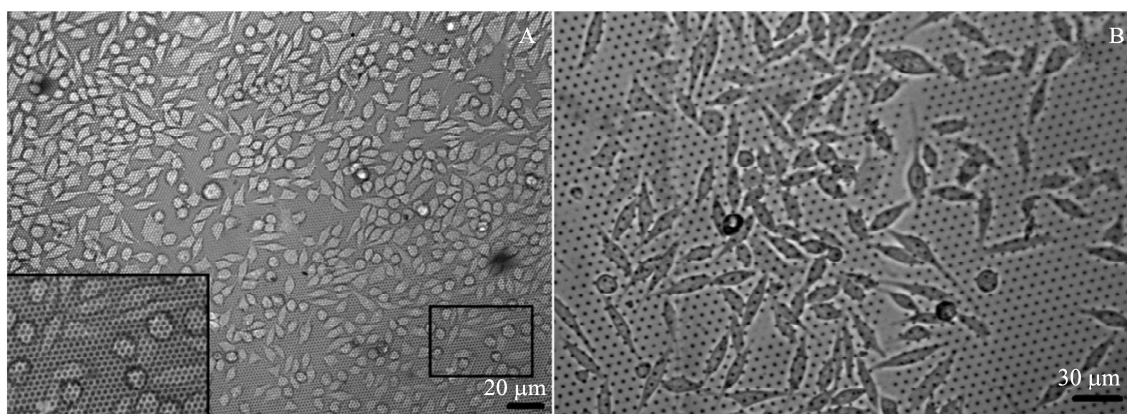


图 1 SH-SY5Y 细胞在 2-2 μm 和 2-7 μm PLLA 微柱阵列型拓扑结构基底上培养 12 h 后相差显微镜图

Fig. 1 Phase contrast microscopic images of SH-SY5Y human neuroblastoma cells interfaced with 2-2 μm and 2-7 μm poly-L-lactide pillar arrayed topographic substrate after 12 h of culture. Topographic substrates were represented by nominal pillar diameter-nominal spacing in micrometers. (A) 2-2 μm topographic substrate. (B) 2-7 μm topographic substrate; The insert on the left bottom of image (A) represents magnification of the boxed region to the right of the image.

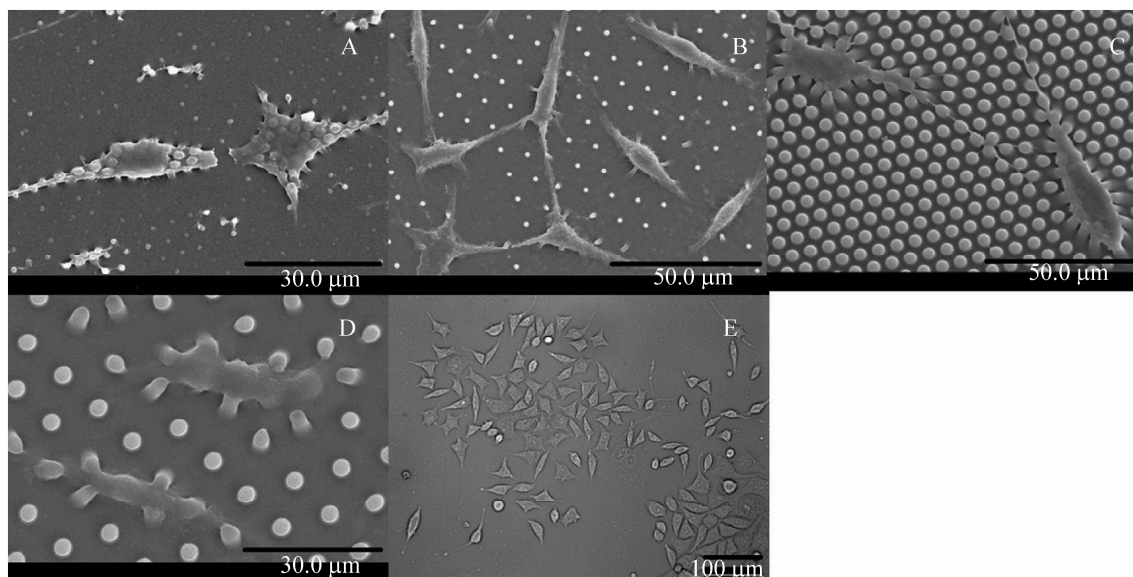


图 2 SH-SY5Y 细胞在 4 种微柱阵列型拓扑结构基底和 PLLA 平面基底上培养 24 h 后的扫描电子显微图和相差显微镜图

Fig. 2 Scanning electronic (SEM) and phase contrast microscopic images of SH-SY5Y human neuroblastoma cells interfaced with PLLA flat and micropillar arrayed topographic substrates after 24 h of culture. Topographic substrates were represented by nominal pillar diameter-nominal spacing in micrometers. Images (A-D) show the SEM images for cells on topographic substrates. (A) 2-2 μm topographic substrate. (B) 2-7 μm topographic substrate. (C) 4-2 μm topographic substrate. (D) 4-7 μm topographic substrate. Image (E) shows the phase contrast microscopic image for cells on PLLA flat substrates.

于圆形, 少有神经突起。为了定量考察 PLLA 微柱阵列型拓扑基底对细胞形态的影响, 我们采用 Image J 软件对拓扑结构基底和二维平面基底上培养细胞进行了形态分析, 测量细胞铺展面积 (投影面积) 和周长, 并以此计算出细胞圆度 (表 2)。从表 2 可以发现, 在 2-2 μm 、2-7 μm 、4-7 μm 拓扑结构基底上细胞铺展面积显著小于 PLLA 平面基底上细胞的相应值 ($P < 0.01$); 在 4-2 μm 拓扑结构基底上细胞的铺展面积较 PLLA 平面基底上细胞趋于降低, 但这一差异并不显著 ($P > 0.05$)。从表 2 还可以发现, 在 2-7 μm 拓扑结构基底上细胞圆度为 0.34 ± 0.09 ($n=57$), 明显小于 PLLA 平面基底上的细胞圆度 0.40 ± 0.10

($n=66$) ($P < 0.01$); 与此相反, 在 2-2 μm 、4-2 μm 和 4-7 μm 拓扑结构基底上细胞圆度均大于 PLLA 平面基底上的相应值 ($P < 0.01$)。上述形态测量结果表明, SH-SY5Y 细胞在拓扑结构基底上较之平面基底上铺展程度趋于降低或明显降低。在 2-7 μm 拓扑结构基底上细胞较之其余 3 种拓扑结构基底和平面基底上细胞较小的圆度值表明该拓扑结构基底上细胞具有更高的极化程度和形态分化趋势。

我们用 FITC-phalloidin 对微柱阵列型拓扑结构基底及二维平面基底上 SH-SY5Y 细胞的肌动蛋白骨架进行了免疫荧光染色。图 3 为 SH-SY5Y 细胞经 FITC-phalloidin 染色的激光共

表 2 SH-SY5Y 细胞在 PLLA 平面基底和微柱阵列型拓扑结构基底上的形态铺展

Table 2 Morphological spreading of SH-SY5Y human neuroblastoma cells interfaced with PLLA flat substrate and micropillar arrayed topographic substrates

Substrates	Spreading area (μm^2)	Perimeter (μm)	Roundness	n
2-2 μm	167.31 \pm 60.97 **	69.32 \pm 17.38 **	0.44 \pm 0.11 **	66
2-7 μm	173.68 \pm 64.64 **	80.98 \pm 17.59	0.34 \pm 0.09 **	57
4-2 μm	212.03 \pm 71.79	78.48 \pm 13.77 *	0.43 \pm 0.08 **	62
4-7 μm	165.46 \pm 39.20 **	63.89 \pm 11.19 **	0.52 \pm 0.09 **	64
FLAT	223.63 \pm 75.71	84.29 \pm 17.99	0.40 \pm 0.10	66

Notes: values were presented as $\bar{x} \pm s$. Topographic substrates were represented by nominal pillar diameter-nominal spacing in micrometers. FLAT refers to two-dimensional flat PLLA substrates. Cell morphological spreading was evaluated with SEM or phase contrast microscopic images (Fig. 2). Spreading (projection) areas and perimeters were measured by tracking the cell contours enclosing the cell bodies and lamellipodia. Roundness was defined as $4 \times \pi \times \text{area} / (\text{perimeter})^2$. Statistically significant difference probability values for comparison with those for cells on PLLA flat substrates: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. n: number of cells measured.

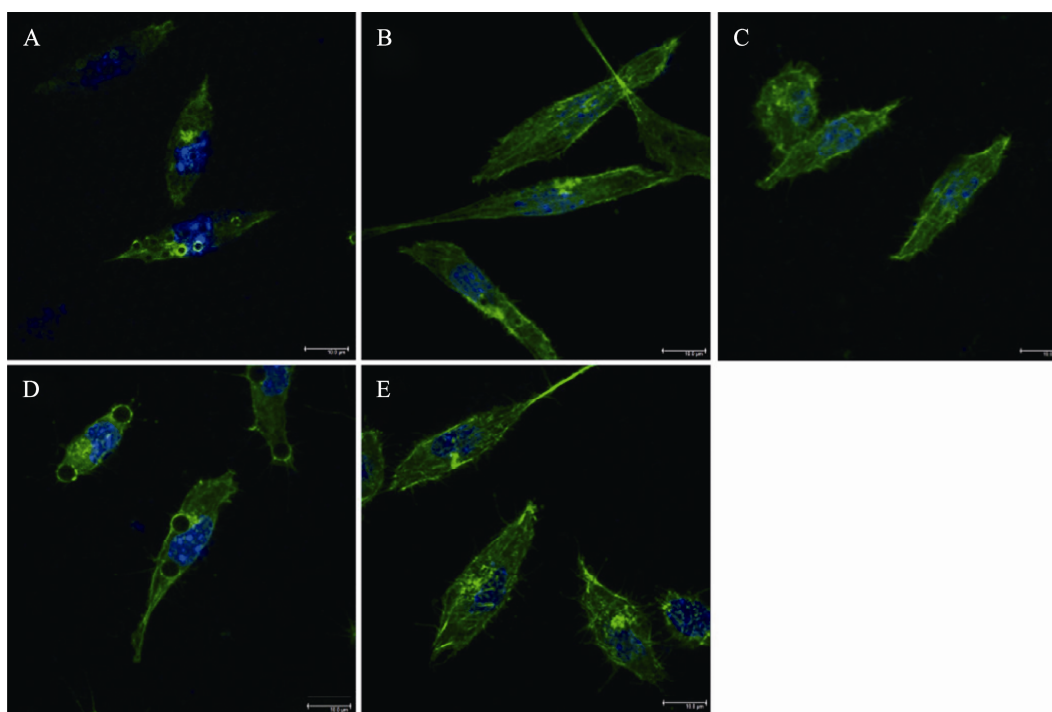


图 3 SH-SY5Y 细胞在 PLLA 微柱阵列型拓扑结构基底和平面基底上培养 24 h 后肌动蛋白骨架染色的激光共聚焦显微镜图

Fig. 3 Confocal microscopic images of SH-SY5Y human neuroblastoma cells on PLLA micropillar arrayed topographic substrates and PLLA flat substrates stained for actin cytoskeleton 24 h after plating. Topographic substrates were represented by nominal pillar diameter-nominal spacing in micrometers. (A) 2-2 μm topographic substrate. (B) 2-7 μm topographic substrate. (C) 4-2 μm topographic substrate. (D) 4-7 μm topographic substrate. (E) flat substrate. Actin cytoskeleton (green) was stained with FITC-phalloidin in a concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ while cell nuclei (blue) were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in a concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

聚焦显微照片。从图中可见,在微柱阵列型拓扑结构基底及二维平面基底上 SH-SY5Y 细胞均出现明显的肌动蛋白荧光染色,其中在平面基底及 4-2 μm 和 2-7 μm 拓扑结构基底上可观察到细胞中清晰的肌动蛋白微丝结构,与细胞长轴一致,贯穿整个细胞,止于细胞边缘。微丝结构在平面基底上 SH-SY5Y 细胞中最为明显。而在 2-2 μm 、4-7 μm 拓扑结构基底上细胞无明显的肌动蛋白微丝结构。

2.2 SH-SY5Y 细胞在 PLLA 微柱阵列型拓扑结构基底及 PLLA 二维平面基底上 VEGF 和 IL-8 蛋白的分泌水平

表 3 和表 4 分别为 SH-SY5Y 细胞在 PLLA 平面基底和微柱阵列型拓扑结构基底上 VEGF 及 IL-8 分泌量的 ELISA 检测结果。实验中对 SH-SY5Y 细胞进行无血清培养 24 h 后,收集上清液检测得 VEGF、IL-8 的分泌浓度,经 MTT 法测得的细胞数目归一化后即得两种因子在 24 h 内

的分泌量。从表 3 中数据可见,与 PLLA 平面结构上细胞 VEGF 分泌量 $[(10.15\pm 2.9) \text{ pg}/10^4 \text{ cells}]$ 相比,SH-SY5Y 细胞在 2-7 μm $[(14.67\pm 5.34) \text{ pg}/10^4 \text{ cells}]$ 和 4-7 μm $[(18.91\pm 8.8) \text{ pg}/10^4 \text{ cells}]$ 拓扑结构基底上的 VEGF 分泌量明显增高($P < 0.05$),而在 2-2 μm 和 4-2 μm 拓扑结构基底上细胞的 VEGF 分泌量则趋于增高 ($P > 0.05$)。从表 4 可见,与 PLLA 平面基底上细胞的 IL-8 分泌量 $[(3.85\pm 1.47) \text{ pg}/10^4 \text{ cells}]$ 相比,SH-SY5Y 细胞在 2-2 μm $[(8.33\pm 2.32) \text{ pg}/10^4 \text{ cells}]$ 和 2-7 μm $[(9.35\pm 4.30) \text{ pg}/10^4 \text{ cells}]$ 拓扑结构基底上的 IL-8 分泌量明显增高 ($P < 0.05$),而在 4-2 μm 和 4-7 μm 拓扑结构基底上的分泌量则趋于增高 ($P > 0.05$)。从上述结果我们可以发现,SH-SY5Y 细胞在本文所加工的 4 种 PLLA 拓扑结构基底上的 VEGF 和/或 IL-8 分泌量较之 PLLA 平面结构上明显增高或趋于增高,其中在 2-7 μm 拓扑结构基底上 VEGF 和 IL-8 的分泌量同时出现明显的增高。

表 3 SH-SY5Y 细胞在 PLLA 平面基底和微柱阵列型拓扑结构基底上 VEGF 的分泌量

Table 3 Secretion of VEGF by SH-SY5Y human neuroblastoma cells interfaced with PLLA flat substrates and micropillar arrayed topographic substrates

Substrates	Medium VEGF concentration (pg/mL)	Cell density (10^4 cells/mL)	Cellular yield of VEGF (pg/ 10^4 cells·24 h)
2-2 μm	6.34 \pm 2.96	0.56 \pm 0.24	13.14 \pm 5.18
2-7 μm	6.73 \pm 3.35	0.48 \pm 0.14	14.67 \pm 5.34 *
4-2 μm	7.71 \pm 2.15	0.65 \pm 0.3	10.62 \pm 3.21
4-7 μm	7.37 \pm 2.9	0.47 \pm 0.25	18.91 \pm 8.8 *
FLAT	7.24 \pm 4.24	0.74 \pm 0.46	10.15 \pm 2.9

Notes: values were presented as $\bar{x} \pm s$ of 8 measurements. Topographic substrates were represented by nominal pillar diameter-nominal spacing in micrometers. FLAT refers to two-dimensional flat PLLA substrates. Medium VEGF concentrations were detected using the enzyme linked immunosorbent assay 24 h after culture in serum-free DMEM medium. Cell densities were determined with methylthiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Concentrations and cell densities were evaluated in a volume of 1 mL. The 24 h cellular VEGF yield was defined as medium concentration divided by cell density. Statistically significant difference probability values for comparison with those for cells on flat substrates: * $P < 0.05$.

表 4 SH-SY5Y 细胞在 PLLA 平面基底和微柱阵列型拓扑结构基底上 IL-8 的分泌量

Table 4 Secretion of VEGF by SH-SY5Y human neuroblastoma cells interfaced with PLLA flat substrates and micropillar arrayed topographic substrates

Substrates	Medium IL-8 concentration (pg/mL)	Cell density (10^4 cells/mL)	Cellular yield of IL-8 (pg/ 10^4 cells·24 h)
2-2 μ m	4.24 \pm 1.53	0.56 \pm 0.24	8.33 \pm 2.32 *
2-7 μ m	4.73 \pm 2.24	0.48 \pm 0.14	9.35 \pm 4.30 *
4-2 μ m	3.35 \pm 1.88	0.65 \pm 0.3	5.16 \pm 2.39
4-7 μ m	2.12 \pm 1.77	0.47 \pm 0.25	4.01 \pm 2.83
FLAT	2.93 \pm 1.12	0.74 \pm 0.46	3.85 \pm 1.47

Notes: values were presented as $\bar{x} \pm s$ of 8 measurements. Topographic substrates were represented by nominal pillar diameter-nominal spacing in micrometers. FLAT refers to two-dimensional flat PLLA substrates. Medium IL-8 concentrations were detected using the enzyme linked immunosorbent assay 24 h after culture in serum-free DMEM medium. Cell densities were determined with MTT assay. Concentrations and cell densities were evaluated in a volume of 1 mL. The 24 h cellular IL-8 yield was defined as medium concentration divided by cell density. Statistically significant difference probability values for comparison with those for cells on flat substrates: * $P < 0.05$.

2.3 SH-SY5Y 细胞在 PLLA 微柱阵列型拓扑结构基底及二维平面基底上 VEGF、IL-8 的 mRNA 相对表达水平

我们采用 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 对 SH-SY5Y 细胞在 PLLA 微柱阵列型拓扑结构基底及 PLLA 二维平面基底上 VEGF、IL-8 的 mRNA 表达量进行了检测, 以 GAPDH 为内参基因并采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因 mRNA 相对表达量, 定量评价 mRNA 的相对表达水平。图 4 为 SH-SY5Y 细胞在 PLLA 微柱阵列型拓扑结构基底及 PLLA 二维平面基底上 VEGF 的 mRNA 相对表达量。从图中可见, 在 4 种拓扑结构基底上 SH-SY5Y 细胞 VEGF 表达量较之 PLLA 平面基底上相应表达量均出现大幅度明显增高 ($P < 0.01$), 且 4 种拓扑结构基底间细胞 mRNA 的相对表达水平并无明显差异 ($P > 0.05$)。图 5 为 SH-SY5Y 细胞在 PLLA 微柱阵列型拓扑结构基底及 PLLA 二维平面基底上 IL-8 的 mRNA 相对表达量。图 5 所示结果表明, 在 2-7 μ m 拓扑结构基底上 SH-SY5Y 细胞 IL-8 mRNA 表达量显著

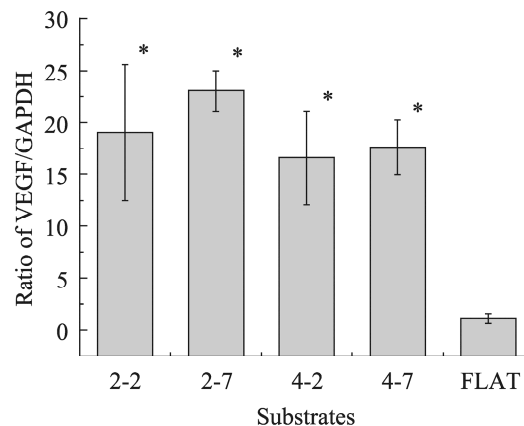


图 4 SH-SY5Y 细胞在 PLLA 微柱阵列型拓扑结构基底及二维平面基底上 VEGF mRNA 相对表达量

Fig. 4 Relative expression of VEGF mRNA by SH-SY5Y human neuroblastoma cells interfaced with PLLA flat substrates and micropillar arrayed topographic substrates. Values were presented as $\bar{x} \pm s$ of 3 measurements. Topographic substrates were represented by nominal pillar diameter-nominal spacing in micrometers. FLAT refers to two dimensional flat PLLA substrates. Measurements were carried out 24 h after culture in serum-free condition. The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used to calculate the VEGF expression relative to GAPDH. Statistically significant difference probability values for comparison with that for cells on PLLA flat substrates: * $P < 0.01$.

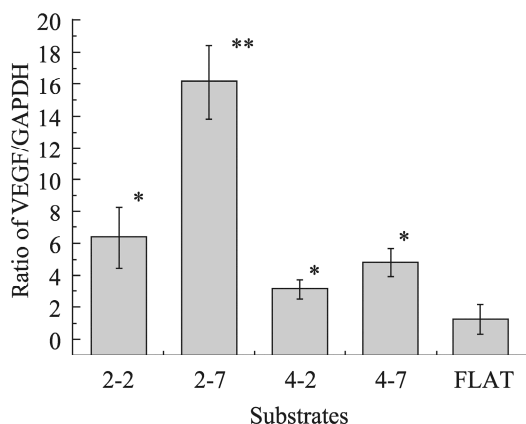


图5 SH-SY5Y细胞在PLLA微柱阵列型拓扑结构基底及二维平面基底上IL-8 mRNA相对表达量

Fig. 5 Relative expression of IL-8 mRNA by SH-SY5Y human neuroblastoma cells interfaced with PLLA flat substrates and micropillar arrayed topographic substrates. Values were presented as $\bar{x} \pm s$ of 3 measurements. Topographic substrates were represented by nominal pillar diameter-nominal spacing in micrometers. FLAT refers to two dimensional flat PLLA substrates. Measurements were carried out 24 h after culture in serum-free condition. The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used to calculate the IL-8 expression relative to GAPDH. Statistically significant difference probability values for comparison with that for cells on PLLA flat substrates: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

高于 PLLA 平面基底上细胞的相应表达量 (升高 12.6 倍, $P < 0.01$), 而在其余 3 种拓扑结构基底上细胞 IL-8 表达量仅略高于 PLLA 平面基底上细胞的相应表达量 (升高 1.6~4.4 倍, $P < 0.05$)。

3 讨论

相比传统的培养皿制备方法, 采用微加工技术制备细胞培养基底能够精确控制基底材料在微米乃至亚微米级的结构尺寸和材料特性, 这使得系统研究基底微拓扑结构与细胞功能的相关性成为可能, 在细胞微环境的工程化构建中具有

重要意义。文中制备阵列型拓扑结构基底采用的紫外光光刻及复制模塑是微米级加工的成熟手段, 具备大面积和大规模快速制备能力以及设备技术简单等特点, 类似的方法已经被用于制备高结构或高纵横比拓扑结构基底^[18]。另一方面, PLLA 是在组织工程及临床医学中广泛使用的生物可降解材料, 其细胞相容性已经被很多的研究所证实^[19], 是潜在的细胞或组织芯片理想的基底材料^[14]。我们以 PLLA 制备了名义高度为 4 μm , 名义直径分别为 2 μm 和 4 μm , 名义间距分别为 2 μm 和 7 μm 的 4 种微柱阵列型拓扑结构基底。实验发现, 以 PLLA 制备的阵列型拓扑结构清晰、规整, 微结构几何尺寸符合设计预期要求。与 PDMS 微柱阵列型拓扑结构基底类似^[12], PLLA 微柱阵列型拓扑结构在扫描电子显微制样后也出现小结构 (2 μm 微柱) 的断裂或破坏, 但在培养条件下微结构稳定并保持完整的拓扑结构阵列。这表明紫外光光刻及复制模塑是制备 PLLA 微柱阵列型拓扑结构基底的有效手段。

我们实现了 SH-SY5Y 细胞在 PLLA 微柱阵列型拓扑结构基底上的复合和培养, 提示该基底可作为理想的细胞或组织芯片培养基底。从结构纵横比上看, 制备的拓扑结构基底其名义纵横比已经达到 1 和 2, 可以被认为类似三维微结构基底。然而, 由于细胞大小与微结构尺寸的差异, 在这些基底上通常不一定能形成经典的三维细胞生长。从这一意义出发, 研究拓扑结构上细胞生长的形态与功能特点, 并考察其与二维平面基底以及大结构和高纵横比三维图式上细胞生长行为的相关性具有重要的意义。

我们以扫描电子显微镜的方法对 SH-SY5Y 细胞在拓扑结构基底上培养生长的形态及铺展

进行了分析。结果发现,在4种 PLLA 拓扑结构基底和1种 PLLA 二维平面基底中,2-2 μm 和 4-2 μm 拓扑结构基底上细胞与 PLLA 平面基底上细胞形态相似,而 2-7 μm 拓扑结构基底上细胞表现出高的极化和形态分化趋势以及与之相应的最小细胞圆度值,4-7 μm 拓扑结构基底上细胞形态却更趋向于圆形并具有最大的细胞圆度值。这一结果提示拓扑结构基底的微结构尺寸是影响细胞形态及分化的重要因素。对 PLLA 拓扑结构基底上细胞铺展面积的定量分析发现,与平面二维基底上的细胞相比较,拓扑结构基底上的细胞铺展程度明显降低或趋于降低。这一细胞形态学测量结果与细胞骨架的免疫荧光染色结果一致。较大程度铺展的 SH-SY5Y 细胞具有清晰的肌动蛋白微丝结构,尤其是平面基底上的细胞。而 2-2 μm 和 4-7 μm 拓扑结构基底上细胞由于铺展程度低没有明显的肌动蛋白微丝。前期以 Cytodex 微球致密阵列三维拓扑结构基底^[20]和 PLLA 三维微小凹图式^[14]的研究发现,SH-SY5Y 细胞在细胞三维培养的微小凹图式或拓扑结构基底上呈明显的三维分布或聚集生长。与此同时细胞铺展程度明显降低。结合本文对拓扑结构基底上细胞形态及铺展的研究结果,我们认为在现有 PLLA 微柱阵列型拓扑结构上 SH-SY5Y 细胞的铺展程度明显不同于二维平面基底上培养的细胞,与前期三维拓扑结构基底上三维生长细胞具有类似的生长与铺展特征。与经典的二维培养体系相比,在三维培养体系中细胞通常表现出更圆的细胞形态和更低的铺展程度,这种形态学的改变是进一步诱导细胞三维功能表型的基础^[21]。

对拓扑结构基底上细胞 VEGF 和 IL-8 的分

泌量进行分析后发现,SH-SY5Y 细胞在所制备的4种 PLLA 拓扑结构基底上的 VEGF 和/或 IL-8 分泌量较之 PLLA 平面结构上明显增高或趋于增高,其中在 2-7 μm 拓扑结构基底上 VEGF 和 IL-8 的分泌量同时出现明显的增高。对 mRNA 表达水平进行实时荧光定量 PCR 检测发现,SH-SY5Y 细胞在拓扑结构基底上 VEGF 和 IL-8 的 mRNA 表达量亦不同程度地高于平面结构上细胞的表达量,其中在 2-7 μm 拓扑结构基底上 VEGF 和 IL-8 的 mRNA 表达量较之平面结构上均出现大幅度的上调(分别上升 20.5 倍和 12.64 倍)。上述 VEGF 和 IL-8 的分泌和表达的增高均伴有细胞铺展程度的明显降低。在三维微小凹图式条件下,可以发现微小凹内分布的三维细胞及近似二维(或边界二维)细胞的铺展程度小于平面基底上二维细胞的相应值^[13-14]。与此同时,研究发现微小凹内 SH-SY5Y 细胞的 VEGF 和 IL-8 分泌量较之平面结构上二维细胞的相应值出现明显上调(待发表资料)。上述结果提示,SH-SY5Y 细胞在微柱阵列型拓扑结构基底上与在三维微小凹条件下具有类似的 VEGF 和 IL-8 分泌和表达行为。

SH-SY5Y 细胞在 PLLA 拓扑结构基底上 VEGF 和 IL-8 表达和分泌量较之平面结构的相应值出现上调,且这一表达和分泌量的上调伴随细胞铺展面积的明显降低,这一结果提示 VEGF 和 IL-8 有可能作为 SH-SY5Y 细胞在拓扑结构基底上特定生长状态的分泌物标志。值得注意的是,本研究中细胞在拓扑结构基底和平面结构具有类似的接种和生长密度(表3和表4),这表明细胞的形态及分化行为可能是影响 VEGF 和 IL-8 表达和分泌量的重要因素。SH-SY5Y 细胞在

2-7 μm 拓扑结构基底上除铺展程度降低外,还表现出高的极化程度、最小的细胞圆度值及部分微丝形成等形态分化的特征。与此同时,在该拓扑结构基底上 VEGF 和 IL-8 二者的分泌和表达均同时出现明显或大幅度的升高。这一现象提示,SH-SY5Y 细胞在拓扑结构基底上 VEGF、IL-8 表达和分泌的增高不仅取决于细胞的形态铺展降低,可能也与细胞的分化状态有明显的相关关系。另一方面,尽管现有的拓扑结构基底引起 SH-SY5Y 细胞形态铺展降低以及 VEGF 和 IL-8 分泌和表达的上调,采用一种能引起细胞铺展程度增加的拓扑结构设计并考察神经细胞功能分化以及相应 VEGF 和 IL-8 的分泌和表达可能具有不同的应用前景。有关这一问题值得进一步研究。

拓扑结构基底是工程化构建细胞培养微环境进而调控细胞的形态和功能分化的重要工具。使用拓扑结构基底进行细胞培养时一个最明显的早期现象是细胞形态和铺展的改变。而细胞铺展程度的改变则伴随着核内相关事件,在调节下游功能分化相关的信号分子的表达中有着重要的作用^[22-24]。对于神经细胞,三维及拓扑结构在影响细胞的形态铺展及分化的同时也是调控神经细胞离子通道,如 VGCCs^[13-14,20,25]功能响应性的有效手段。

建立神经细胞在三维及拓扑结构培养条件下的分泌物标志的意义是,分泌物标志提供了细胞在三维或拓扑结构基底上特定生长状态的简易、快速而实用的评价手段。不仅如此,有关分泌物标志的确立也将为神经细胞在拓扑结构和三维微结构条件下离子通道功能响应性的研究提供重要的参考。对于 VEGF 和 IL-8,已

有的研究表明在三维条件下该二因子的分泌和表达也出现明显上调^[15,17,26],且 VEGF 和 IL-8 是影响神经细胞功能分化的调节因子^[27-28]。近年的研究更进一步表明,VEGF 和 IL-8 是调节神经细胞 VGCCs 门控特性或功能响应性的重要细胞因子^[16,28]。使用外源性 VEGF、IL-8 分别作用于二维条件下 SH-SY5Y 细胞发现,在特定的浓度范围内 VEGF (2~200 ng/mL) 和 IL-8 (0.0005-1 nmol/L) 可以引起细胞 VGCCs 功能响应性明显降低。这一发现提示,VEGF 和 IL-8 有可能是引起三维及拓扑结构条件下神经细胞 VGCCs 功能响应性改变的值得关注的机制之一。

4 结论

本文成功制备了微柱名义直径为 2 μm 和 4 μm 、微柱名义间距为 2 μm 和 7 μm 的 4 种阵列型拓扑结构基底,并实现了 SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞与 PLLA 拓扑结构基底的复合。研究发现,SH-SY5Y 细胞在 2-2 μm 、4-2 μm 、4-7 μm 拓扑结构基底上的 VEGF 或 IL-8 表达和分泌量相比平面结构的相应值出现上调,而在 2-7 μm 拓扑结构基底上 VEGF 及 IL-8 二者同时表现出表达和分泌量的上调。与在 PLLA 平面基底上相比,SH-SY5Y 细胞在拓扑结构基底上表现出细胞形态(铺展面积、圆度及肌动蛋白微丝)的明显变化,细胞 VEGF 及 IL-8 表达和分泌量的上调伴随细胞铺展面积的明显降低。上述结果表明阵列型微柱拓扑结构是影响 SH-SY5Y 细胞 VEGF、IL-8 表达的重要微环境因素,VEGF 和 IL-8 可能构成 SH-SY5Y 细胞在拓扑结构基底上

生长的重要分泌物标志。

REFERENCES

- [1] Guck J, Lautenschlager F, Paschke S, et al. Critical review: cellular mechanobiology and amoeboid migration. *Integr Biol*, 2010, 2: 575–583.
- [2] Goodman SL, Sims PA, Albrecht RM. Three-dimensional extracellular matrix textured biomaterials. *Biomaterials*, 1996, 17(21): 2087–2095.
- [3] Abrams GA, Goodman SL, Nealey PF, et al. Nanoscale topography of the basement membrane underlying the corneal epithelium of the rhesus macaque. *Cell Tissue Res*, 2000, 299(1): 39–46.
- [4] Pamula E, De Cupere V, Dufrene YF, et al. Nanoscale organization of adsorbed collagen: influence of substrate hydrophobicity and adsorption time. *J Colloid Interface Sci*, 2004, 271(1): 80–91.
- [5] Harrison RG. On the stereotropism of embryonic cells. *Science*, 1911, 34(870): 279–281.
- [6] Weiss P. Nerve patterns: the mechanics of nerve growth. *Growth*, 1941, 5(Suppl): 163–203.
- [7] Flemming RG, Murphy CJ, Abrams GA, et al. Effects of synthetic micro and nanostructured surfaces on cell behavior. *Biomaterials*, 1999, 20(6): 573–588.
- [8] Hasirci V, Kenar H. Novel surface patterning approaches for tissue engineering and their effect on cell behavior. *Nanomedicine*, 2006, 1(1): 73–90.
- [9] Curtis ASG, Dalby M, Gadegaard N. Cell signaling arising from nanotopography: implications for nano-medical devices. *Nanomedicine*, 2006, 1(1): 67–72.
- [10] Chen CS, Mrksich M, Huang S, et al. Geometric control of cell life and death. *Science*, 1997, 276(5317): 1425–1428.
- [11] Nikkhah M, Edalat F, Manoucheri S, et al. Engineering microscale topographies to control the cell-substrate interface. *Biomaterials*, 2012, 33(21): 5230–5246.
- [12] Wu ZZ, Zhu MG, Kisaalita WS, et al. Fabrication of arrayed topographic substrates and their effects on the electrophysiological properties of neuronal cells. *Chin J Sensor Actuat*, 2011, 24(4): 467–474 (in Chinese).
吴泽志, 朱满根, Kisaalita WS, 等. 阵列型微拓扑结构基底的制备及其对神经细胞电生理物理特性的影响. *传感技术学报*, 2011, 24(4): 467–474.
- [13] An ZX, Huang QP, Wang ZW, et al. VGCC responsiveness of SH-SY5Y human neuroblastoma cells in the PLLA three-dimensional microwell patterns. *Chin J Sensor Actuat*, 2012, 25(3): 307–312 (in Chinese).
安治星, 黄岂平, 王正伟, 等. 聚乳酸三维微结构条件下人神经母细胞瘤细胞电压依从式钙通道的功能响应性. *传感技术学报*, 2012, 25(3): 307–312.
- [14] Wu ZZ, Wang ZW, Zhang LG, et al. Responsiveness of voltage-gated calcium channels in SH-SY5Y human neuroblastoma cells on quasi-three-dimensional micropatterns formed with poly(l-lactic acid). *Inter J Nanomed*, 2013, 8: 93–107.
- [15] Klapperich CM, Bertozzi CR. Global gene expression of cells attached to a tissue engineering scaffold. *Biomaterials*, 2004, 25(25): 5631–41.
- [16] Cheng K, Lai Y, Kisaalita WS. Three-dimensional polymer scaffolds for high throughput cell-based assay systems. *Biomaterials*, 2008, 29(18): 2802–2812.
- [17] Fischbach C, Kong HJ, Hsiong SX, et al. Cancer cell angiogenic capability is regulated by 2D culture and integrin engagement. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(2): 399–404.
- [18] Zhang LG, Wu ZZ, Song ZQ, et al. Fabrication of

- three-dimensional microwell patterns and their integration with C17.2 neural stem cells. *J Biomed Eng*, 2012, 29(3): 555–562 (in Chinese).
- 张利光, 吴泽志, 宋兆全, 等. 三维微小凹图式的制备及其与 C17.2 神经干细胞的复合. *生物医学工程学杂志*, 2012, 29(3): 555–562.
- [19] Zhe SL. The application of PLA/PLGA in tissue engineering. *J Tissue Eng Reconstr Surg*, 2011, 7(4): 235–237 (in Chinese).
- 折胜利. PLA/PLGA 共聚物在组织工程中的应用. *组织工程与重建外科杂志*, 2011, 7(4): 235–237.
- [20] Wu ZZ, Zhao YP, Kisaalita WS. A packed Cytodex microbead array for three-dimensional cell-based biosensing. *Biosens Bioelectron*, 2006, 22(5): 685–693.
- [21] Guilak F, Cohen DM, Estes BT, et al. Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(1): 17–26.
- [22] Versaevel M, Grevesse T, Gabriele S. Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endothelial cells. *Nat Commun*, 2012, 3: 671.
- [23] Thomas CH, Collier JH, Sfeir CS, et al. Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(4): 1972–1977.
- [24] Dalby MJ, Riehle MO, Sutherland DS, et al. Use of nanotopography to study mechanotransduction in fibroblasts—methods and perspectives. *Eur J Cell Biol*, 2004, 83(4): 159–69.
- [25] Wu ZZ, Kisaalita WS, Wang L, et al. Effects of topography on the functional development of human neural progenitor cells. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 106(4): 649–659.
- [26] Lai Y, Amish A, Kisaalita WS. Biomarkers for simplifying HTS 3D cell culture platforms for drug discovery: the case for cytokines. *Drug Disc Today*, 2011, 16(7/8): 293–297.
- [27] Meng H, Zhang Z, Zhang R, et al. Biphasic effects of exogenous VEGF on VEGF expression of adult neural progenitors. *Neurosci Lett*, 2006, 393(2/3): 97–101.
- [28] Puma C, Danik M, Quirion R, et al. The chemokine interleukin-8 acutely reduces Ca^{2+} currents in identified cholinergic septal neurons expressing CXCR1 and CXCR2 receptor mRNAs. *J Neurochem*, 2001, 78(5): 960–971.

(本文责编 郝丽芳)