

[文章编号] 1007-385X(2006)05-0338-05

硅和玻璃片基上的三维微结构对乳腺癌 MCF-7 细胞生长的影响

张保增, 陈 迪, 崔大祥, 潘碧峰(上海交通大学 微纳科学技术研究院, 微纳制造技术国家重点实验室, 薄膜与微细技术教育部重点实验室, 上海 200030)

[摘 要] **目的:** 研究硅和玻璃片基上的三维微结构对乳腺癌 MCF-7 细胞生长的影响。**方法:** 采用 SU-8 光刻胶光刻微加工技术在硅和玻璃片基表面制造沟槽、五角星、齿轮状 3 种三维微结构, 与乳腺癌 MCF-7 细胞共培养, 用倒置显微镜与扫描电镜观察三维微结构对肿瘤细胞的形态、分布、生长的影响, 采用 MTT 法分析三维微结构对肿瘤细胞增殖的影响, 用流式细胞仪分析凋亡细胞。**结果:** 成功制作微米尺度带有不同深宽比的沟槽、五角星、齿轮。显微镜观察显示, MCF-7 细胞喜欢在微结构的深槽中生长, 特别是边角部位, 而微结构的顶部及周边部位细胞非常少; 悬浮细胞呈圆形且较多, 作为对照的硅片基表面细胞分布稀疏, 轻轻晃动后, 细胞上浮; 而玻璃片基表面对照细胞分布浓密, 呈梭形, 悬浮细胞很少。MTT 分析显示, 随着培养时间的增加, 玻璃片基与硅片基微结构中细胞增殖抑制率增加显著($P < 0.05$, $P < 0.01$)。流式细胞仪分析显示, 随着培养时间增加, 玻璃片基与硅片基上的微结构诱导的凋亡细胞率增加显著($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:** 在微米尺度带有不同深宽比的沟槽、五角星、齿轮微结构能够抑制 MCF-7 细胞的生长, 并诱导细胞凋亡。此现象在肿瘤治疗方面具有潜在的应用价值。

[关键词] 三维微结构; 微制造; 乳腺癌细胞; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R730 [文献标识码] A

Effects of three-dimensional microstructures on silicon and glass substrates on growth of breast cancer cell line MCF-7

ZHANG Bao-zeng, CHEN Di, CUI Da-xiang, PAN Bi-feng (National Key Laboratory of Nano/Micro Fabrication Technology, Key Laboratory for Thin Film and Microfabrication, Ministry of Education, Institute of Micro/Nano Science and Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of three-dimensional microstructures of silicon and glass substrates on the growth of breast cancer cell line MCF-7. **Methods:** Three-dimensional microstructures (grooves, pentagons, and gear wheels) of silicon and glass substrates were fabricated by micro-fabrication technology, and were then co-cultured with MCF-7 cells for 1- 4 days. Phase contrast microscope and scanning electron microscopy were used to observe the distribution, size, shape, and growth of MCF-7 cells, MTT was used to analyze the effects of the microstructures on the proliferation of MCF-7 cells, and flow cytometry was used to analyze the amounts of apoptosis cells. **Results:** These microstructures, including grooves, pentagram and gear wheels, were successfully fabricated by micro-fabrication technology. MCF-7 cells were prone to grow on the bottom of grooves, pentagram and gear wheels; few cells were observed on the top and sidewalls of microstructures. Round suspension cells gradually increased as the cell culture time increased. Few cells existed on the surface of control silicon substrate, and the adhesive cells were easily detached from the substrate; however, abundant spindle-shaped MCF-7 cells grew evenly on the surface of glass substrate. MTT analysis showed that as the culture time increased, the inhibition of cell proliferation on the microstructures on the glass and silicon substrates decreased gradually ($P < 0.01$, $P < 0.05$); flow cytometry analysis showed that as the culture time increased, apoptosis cell number also increased gradually ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion:** Micron level microstructures, such as grooves, pentagram and gear wheels on the substrates of silicon and glass, can inhibit the growth of MCF-7 cells and induce cell apoptosis, which hold much potential for application in tumor therapy.

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划(973 计划) 资助项目(No. 2005CB724300G); 上海市科委科学基金资助项目(No. 054119527)

[作者简介] 张保增, 男(1979-), 河南新乡人, 硕士研究生, 主要从事生物微机电系统方面的研究

[通讯作者] 崔大祥, E-mail: dx cui@ sjtu. edu. cn; 陈 迪, E-mail: dchen@ sjtu. edu. cn

[**Key words**] three-dimensional microstructure; micro-fabrication; breast neoplasm cell; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(5): 338-342]

随着微机电系统(microelectromechanical systems, MEMS)技术的发展,微纳装置及其界面对肿瘤细胞的影响已成为一个新的研究热点^[1]。微纳装置既可用作传感器传导细胞信号,诊断疾病;又可调节细胞形态、分布、生长与凋亡;而且还能够控制进出细胞,可显著影响细胞的生长,这给肿瘤的治疗带来了新的视角与新的靶点^[2-5]。本研究通过采用微制造技术,在微米尺度制造了带有不同深宽比的沟槽、五角星、齿轮,与乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞共同培养,采用形态学观察、MTT 分析以及流式细胞仪检测等方法研究这些微结构对乳腺癌细胞生长的影响,以探讨这些微结构在肿瘤治疗方面的潜在应用前景。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人乳腺癌 MCF-7 细胞株购于上海午立生物技术有限公司,培养基为 RPMI 1640(含 100 ml/L 小牛血清, pH7.4)购于业力生物科技有限公司,四甲基偶氮唑蓝(MTT)购于美国 Sigma 公司, SU-8 GBL 光刻胶购于美国 Microchem 公司,其它化学试剂购于 Sigma 公司。

1.2 三维微结构的制造

本实验采用 UV-LIGA 中的 SU-8 光刻胶光刻技术来制备微结构^[6-11]。具体光刻工艺步骤如图 1 所示: (1)基片清洗:用 H₂SO₄/H₂O₂清洗 2 mm 玻璃片基或硅片基表面,180℃高温下烘烤 4 h;(2)甩胶:用 1 000 r/min 的转速把 SU-8 胶涂敷在玻璃片或硅片上;(3)光刻:前烘、曝光、中烘;(4)甩第二层胶:重复 2、3 步骤,只是更改甩胶、前烘、曝光和中烘参数;(5)显影:放入显影液中晃动显影;(6)清洗:对 SU-8 光刻胶表面进行清洗消毒。由于基片被 SU-8 光刻胶全部覆盖,所以细胞培养结构完全由 SU-8 胶组成,培养结构侧壁和底面对细胞的结合力是相同的。

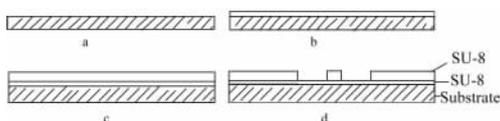


图 1 光刻技术制备 SU-8 微结构工艺流程
Fig 1 Process of fabricating SU-8 microstructure using lithographic process

a: Substrate pretreatment; b: First coat, soft bake, expose and post exposure bake; c: Second coat, soft bake; d: Expose, post exposure bake and development

1.3 MCF-7 细胞培养与形态观察

人乳腺癌细胞 MCF-7 用含 10% 胎牛血清、100 μg/ml 链霉素、100 U/ml 青霉素的 RPMI 1640 (Gibco) 培养液培养于 37℃、5% CO₂ 孵箱中。把硅基片和玻璃基片切割成 2 cm × 2 cm 的小片,置于 6 孔板中,设 3 复孔,每孔加入 1 × 10⁴ 个 MCF-7 细胞和 5ml 的 RPMI 1640 培养液,在 37℃ 环境中培养 1 ~ 4 d,用倒置显微镜与扫描电子显微镜观察细胞形态;每天收集细胞并进行细胞计数,绘制细胞的生长曲线。

1.4 MTT 实验检测细胞增殖

MCF-7 细胞处于对数增长期时,将细胞悬液接种于带有微结构的 24 孔板中,每组设立对照组,分别在培养 24、48、72、96 h 后,小心吸去上清液后,加入 DM-SO 150 μl/孔,震荡溶解后,立即于酶标仪下 570 nm 波长处测定光密度值(D₅₇₀)。按下列公式计算抑制率:抑制率 = (1 - 实验组 D₅₇₀ / 对照组 D₅₇₀) × 100% 。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

将 MCF-7 细胞悬液按 1 × 10⁶ / 孔细胞接种于带有微结构的培养板,分别于 24、48、72、96 h 后,用 0.25% 胰酶消化,收集培养瓶内悬浮及贴壁细胞,PI 染色,流式细胞仪测定细胞凋亡。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,应用 SAS 统计软件包进行统计学分析。

2 结 果

2.1 制备微结构的形态

如图 2A、B 所示, SU-8 光刻胶制作的沟槽,槽深 70 μm,槽侧壁和底部平直光滑,角部无开裂等现象。制作的微结构包括沟槽、五角星与长方体等,深度都是 70 μm。

2.2 微结构对细胞的形态和分布的影响

在细胞培养过程中,显微镜下观察发现,玻璃基片组及空白对照组的细胞数目较多,细胞贴壁良好,细胞透明,呈棱形或多角形,铺满整个玻璃表面;而硅片组细胞贴壁状况不好,大部分贴壁细胞为圆形,细胞数目较对照组明显减少。

电镜照片显示,在三维微结构底面角部细胞数最多,其次在棱上,而微结构的表面上几乎没有细胞。这表明,微结构对细胞生长具有调控作用。通过对玻璃基片上微结构和在硅片基上微结构比较,可以看到,肿瘤细胞贴附在玻璃微结构上的数目比贴附在硅片基微

结构上的数目多。

2.3 硅和玻璃片基对细胞增殖的影响

细胞计数结果如图 3 显示,与正常培养瓶对照组比,玻璃片基对细胞的生长具有一定的抑制作用。硅片基对细胞的生长具有显著抑制作用。肿瘤细胞在硅片基上培养 96 h 后,细胞增长缓慢。这个结果显示玻璃片基对乳腺癌细胞毒性较低,硅片基对乳腺癌细胞具有较强的毒性。

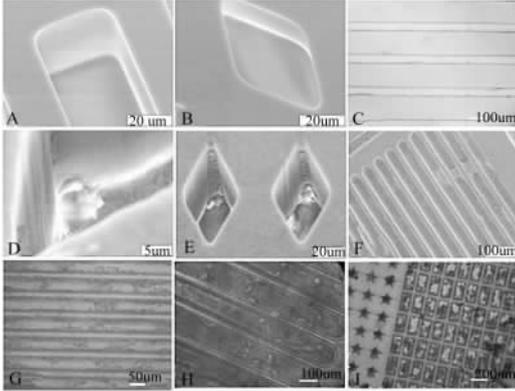


图 2 硅和玻璃片基上制备的 SU-8 胶微结构及其中培养的 MCF-7 细胞的形态

Fig. 2 Configuration of SU-8 microstructure fabricated on silicon and glass and morphology of MCF-7 cancer cells cultured in it

A and B: Pictures of microstructures fabricated on silicon, which are shot by field emission gun scanning electron microscopy (FEG-SEM); C: Picture of another line shape structure fabricated on silicon, which is shot by microscopy with reflex; D, E, and F: Pictures of cancer cells shot by FEG-SEM; G: Picture of cancer cells cultured on SU-8 microstructure fabricated on glass, shot by microscope; H: Picture of cancer cells cultured on SU-8 microstructure fabricated on glass, shot by microscope with transmit light; I: Picture of cancer cells cultured on SU-8 structure fabricated directly on glass, shot by inverted microscope

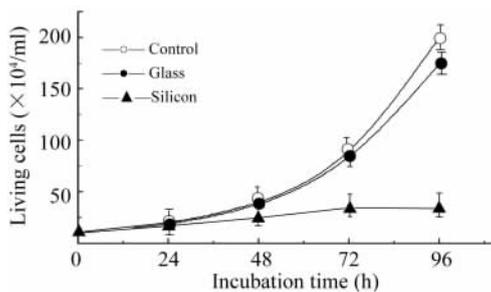


图 3 硅和玻璃片基对 MCF-7 细胞增殖的影响

Fig. 3 Effect of silicon and glass substrate on proliferation of MCF-7 cancer cells

2.4 硅和玻璃片基上微结构对细胞增殖的影响

与对照组相比,随着细胞培养天数的增加,微结构对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用越来越明显,硅片上的微结构的抑制作用显著强于玻璃片基上的微结构,两者之间具有显著差异($P < 0.05$),见表 1。

2.5 微结构对 MCF-7 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果如表 2 所示,随着细胞培养天数的增加,凋亡细胞数所占的比例逐渐增加。

玻璃片基上的微结构组与对照组之间凋亡细胞数存在显著性差异($P < 0.05$);硅片基上的微结构组与对照组之间凋亡细胞数也存在显著性差异($P < 0.01$),表明不同片基上的微结构都能够诱导 MCF-7 细胞凋亡,只是存在数量差异。

3 讨论

随着微纳科学技术的发展,不同的微纳装置与器件被制造,微纳装置及器件的生物兼容性研究也已成为一个新的研究热点,这些方面的进展为人体内肿瘤的治疗带来了新的思路与方向。如把纳米装置直接注射进入人体,在体外磁场等的控制下,纳米装置可直接到达肿瘤部位,进入肿瘤细胞,释放药物等,可杀死肿瘤细胞,达到治疗肿瘤的目的^[2]。本研究通过观察制造的微结构对乳腺癌 MCF-7 细胞的影响,为进一步探索用微纳器件治疗肿瘤奠定基础。

制造高深宽比的微结构,目前主要有 LIGA 技术、DRIE 技术、准分子激光刻蚀和 SU-8 厚胶光刻技术。本研究采用 UV-LIGA 中的 SU-8 光刻胶光刻技术。SU-8 胶是一种负性、环氧树脂型、近紫外线光刻胶。其典型结构中含有八个环氧团,具有良好的化学和热稳定性。对于波长长于 360 nm 的光透明性较好。SU-8 光刻胶生物兼容性较好^[9-10],可以用来制作高深宽比图形,适合于 MEMS 应用,适合制作生物器件。在本研究中使用的 SU-8 双层工艺,使得 SU-8 光刻胶与基底完全匹配,从而避免了开裂、剥离等情况的出现。由于基片被 SU-8 光刻胶全部覆盖,所以细胞培养结构完全由 SU-8 胶组成,所以培养结构侧壁和底面对细胞的结合力是相同的。

本研究结果显示,MCF-7 细胞在微结构上生长具有一定的规律,喜欢生长在微结构的凹陷部分,如底部与边角部,其次是在微结构的管壁,在微结构框架表面上细胞分布非常少。进一步研究发现,不同的片基对细胞的生长具有不同的影响,如硅片基对细胞的生长具有显著的抑制作用,玻璃片基对细胞的生长影响很小。与对照组相比,在玻璃片基上的微结构对 MCF-7 细胞的生长具有一定的抑制作用,说明微结构对细胞

的生长具有一定的抑制作用,在硅片基上的微结构对 MCF-7 细胞的生长具有显著的抑制作用,这说明硅片基的细胞毒性与微结构的细胞抑制作用具有协同作用

或迭加作用,出现这种现象可能与硅材料的特性,以及对细胞的黏附力有关,具体的机制有待进一步研究^[13]。

表 1 玻璃与硅片基上的微结构对 MCF-7 细胞增殖的抑制率(%)

Tab. 1 Proliferation inhibitory rates of MCF-7 cells caused by microstructures

Groups	Culture time (h)			
	24	48	72	96
Glass control	0.43 ± 0.11	1.12 ± 0.22	2.36 ± 0.36	4.23 ± 1.14
Glass based microstructures	0.54 ± 0.21	4.23 ± 1.21	6.93 ± 2.24*	12.8 ± 3.66**
Silicon control	7.56 ± 3.23	16.68 ± 4.46	32.57 ± 5.67	54.8 ± 9.83
Silicon based microstructures	13.34 ± 6.12 [▲]	38.21 ± 11.41 ^{▲▲}	61.67 ± 12.32 ^{▲▲}	83.4 ± 13.46 ^{▲▲*}

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs glass control group; [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$ vs silicon control group

表 2 微结构在不同时间点诱导 MCF-7 细胞凋亡的比率(%)

Tab. 2 Apoptosis cells rates caused by microstructures at different time points

Groups	Culture time (h)			
	24	48	72	96
Glass control	2.13 ± 0.34	3.24 ± 0.42	5.76 ± 1.22	7.63 ± 2.34
Glass based microstructures	2.51 ± 1.2	14.23 ± 2.24	6.93 ± 2.24*	12.8 ± 3.45**
Silicon control	7.86 ± 2.44	13.66 ± 3.46	21.89 ± 5.67	32.7 ± 6.83
Silicon based microstructures	18.34 ± 3.12 [▲]	32.21 ± 4.42 ^{▲▲}	45.67 ± 6.67 ^{▲▲}	76.4 ± 8.96 ^{▲▲}

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs glass control group; [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$ vs silicon control group

关于微结构对 MCF-7 细胞的作用机制,流式细胞仪分析结果表明,随着细胞培养时间增加,凋亡细胞数所占比例逐渐升高,表明微结构能够诱导细胞的凋亡,这可能与微结构改变细胞的分布、黏附力等密切相关。

总之,本研究表明,玻璃与硅片基上的微结构能够抑制 MCF-7 细胞的生长,能够诱导细胞的凋亡,尽管具体的机制仍不清楚,但此结果为进一步探讨微结构在肿瘤治疗方面的应用提供了一定的实验依据。

[参 考 文 献]

[1] Alison A. Biology's new dimension[J]. Nature, 2003, 424 (6951): 870-872.
 [2] 崔大祥. 纳米材料在肿瘤生物治疗中的潜在应用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志. 2006, 13(2): 79-82.
 [3] Nicolini C, Lanzi M, Accossato P, et al. A silicon-based biosensor for real-time toxicity testing in normal versus cancer liver cells [J]. Biosens Bioelectron, 1995, 10(8): 723-733.
 [4] Stevens MM, George JH. Exploring and engineering the cell surface interface [J]. Science, 2005, 310(5751): 1135-1138.
 [5] Tjia JS, Moghe PV. Regulation of cell motility on polymer sub-

strates via "dynamic," cell internalizable, ligand microinterfaces [J]. Tissue Eng, 2002, 8(2): 247-261.

[6] Richards AC, Shawgo RS, Johnson AM, et al. A BioMEMS review: MEMS technology for physiologically integrated devices [J]. Proc IEEE, 2004, 92(1): 6-21.
 [7] Zhang J, Tan KL, Hong GD, et al. Polymerization optimization of SU-8 photoresist and its applications in microfluidic systems and MEMS [J]. J Micromech Microeng, 2001, 11(1): 20-26.
 [8] Lorenz H, Despont M, Fahrni N, et al. High-aspect-ratio, ultrathick, negative-tone near-UV photoresist for MEMS applications [J]. Sensors Actuators A, 1998, 64(1): 33-39.
 [9] Voskerician G, Shive MS, Shawgo RS, et al. Biocompatibility and biofouling of MEMS drug delivery devices [J]. Biomaterials, 2003, 24(11): 1959-1967.
 [10] Milgrew MJ, Hammond PA, Cumming DRS, et al. The development of scalable sensor arrays using standard CMOS technology [J]. Sensors Actuators B, 2004, 103(1): 37-42.
 [11] 张立国, 陈迪, 杨帆, 等. SU-8 胶光刻工艺研究 [J]. 光学精密工程, 2005, 10(3): 266-269.
 [12] Rouahi M, Gallet O, Champion E, et al. Influence of hydroxyapatite microstructure on human bone cell response [J]. J Biomed Mat Res Part A, 2006, 78A(2): 222-235.

[13] Oh S, Daraio C, Chen LH, *et al.* Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO₂ nanotubes[J]. J Biomed Mat Res Part A, 2006, 78(1): 97-103.

[14] Pernodet N, Fang XH, Sun Y, *et al.* Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts[J]. Small, 2006, 2(6): 766-773.

[15] Luo D. Nanotechnology and DNA delivery[J]. MRS Bulletin, 2005, 30(9): 654-658.

[收稿日期] 2006 - 09 - 22

[修回日期] 2006 - 10 - 09

[本文编辑] 韩丹

[文章编号] 1007-385X(2006)05-0342-01

· 研究简报 ·

反义 hTERT 对人舌鳞癌细胞裸鼠移植成瘤的抑制作用

Inhibitory effect of antisense oligodeoxynucleotides against hTERT on nude mice transplantation tumor of Tca 8113 cells

姚晨¹, 姚华², 吴求亮², 范骏³(1. 解放军第113医院检验科, 宁波 315040; 2. 浙江大学医学院附属第一医院口腔中心; 3. 浙江大学医学院附属第一医院传染病研究所, 杭州 310003)

多种癌基因及抑癌基因的异常累积是口腔癌癌变过程的重要机制。已有研究表明,端粒酶逆转录酶(TERT)与癌的发生发展密切相关。本研究将经过 hTERT 反义寡核苷酸预处理后的 Tca 8113 细胞接种于裸鼠,观察处理后的 Tca 8113 细胞对裸鼠皮下移植瘤成瘤的抑制作用,初步探讨 hTERT 为靶点用于开展体内抗癌研究的可行性。

本研究采用对数生长期的舌鳞状细胞癌细胞系 Tca8113 作为靶细胞,分别用 1.0 μmol/L 反义寡核苷酸(ASODN, 序列为 5'-ACT CAC TCA GGC CTC AGA CT-3')、1.0 μmol/L 正义寡核苷酸(SODN, 序列为: 5'-AGT CTG AGG CCT GAG TGA GT -3')、空载体、空白培养液进行转染处理,后 3 组为对照组,24 h 后取 3 × 10⁶ 个的 Tca 8113 细胞接种于随机分成 4 组的 4 ~ 6 周龄健康雌性 BALB/c 裸鼠左后肢前方皮下,连续观测 5 周,计算成瘤时间、瘤体体积,称瘤重。第 5 周末取下完整移植瘤组织,常规病理检查,采用 RT-PCR 法检测 hTERT 基因表达变化,采用 TRAP 酶标法检测端粒酶活性,免疫组化法检测细胞增殖核抗原(PCNA)表达量。所有数据用单因素 ANOVA 方差分析进行统计学处理。

研究结果显示, hTERT 反义寡核苷酸组舌鳞癌 Tca 8113 细胞体内成瘤时间明显延长至(9.67 ± 0.82)d, 瘤体体积为(0.93 ± 0.55)cm³, 明显小于正义寡核苷酸组的(3.31 ± 1.13)cm³、空载体组的(4.01 ± 1.36)cm³和空白培养液组的(3.73 ± 1.07)cm³(*P* < 0.05)。瘤重为(0.72 ± 0.27)g, 明显轻于正义寡核苷酸组的(2.12 ± 0.62)g、空载体组的(2.07 ± 0.35)g 和空白培养液组的(2.25 ± 0.39)g(*P* < 0.05)。hTERT 反义寡核苷酸组瘤组织的 hTERT mRNA 低水平表达

(与空白培养液组相比, *P* < 0.05), 端粒酶活性为(0.739 ± 0.141), 低于对照组(*F* = 33.691, *P* < 0.05)。

近年来,国内外学者利用反义寡核苷酸技术、锤头状核酶等抑制端粒酶进行了一些有意义的探索,认为反义 hTERT 寡核苷酸有抑制肿瘤生长和转移的作用,且疗效与剂量相关。本研究针对 hTERT 设计反义寡核苷酸裸鼠体内抑瘤实验表明在动物模型上取得了较好的抑瘤效果。结果提示, hTERT 反义寡核苷酸直接抑制 hTERT 转录和表达,从而下调端粒酶活性可能是其主要的机制之一。另外,值得注意的是,本研究 1.0 μmol/L 反义寡核苷酸只是部分抑制 hTERT 和端粒酶活性。反义寡核苷酸与靶基因 mRNA 互补,在转录水平阻断癌基因,并可以结合 DNA 大沟形成三角螺旋结构使基因表达失活,但要求不断将反义靶寡核苷酸导入癌细胞,从而使细胞增殖保持抑制状态。因此,选择合适的浓度、转染次数和作用时间是一个值得深入研究的课题。

[关键词] 端粒酶逆转录酶;端粒酶;反义寡核苷酸;人舌鳞癌细胞

[中图分类号] R730

[文献标识码] D

[收稿日期] 2006 - 07 - 24

[修回日期] 2006 - 10 - 08

[本文编辑] 王莹

[基金项目] 浙江省中医药科技计划基金项目(No. 2004098)

[作者简介] 姚晨(1971-), 女, 浙江永康人, 硕士生, 主管技师, 主要从事肿瘤基因治疗与诊断方面的研究

[通讯作者] 姚华, E-mail: yaha@mail.hz.zj.cn