

文章编号:1004-7220(2011)05-0426-06

硅橡胶膜细胞载体的应力分析及生物相容性

马信龙^{1,2}, 李爽^{2*}, 付鑫¹, 孙晓雷¹, 李秀兰¹, 张杨¹, 郭悦¹, 李稚君²

(1. 天津市天津医院 骨科, 天津 300211; 2. 天津医科大学总医院 骨科, 天津 300052)

摘要: 目的 报道一种自制的硅橡胶膜细胞载体,通过三维有限元方法计算其表面应变分布情况,并作细胞生物相容性分析,对材料进行全面评价,为细胞的应力刺激实验提供理论依据。**方法** 将硅橡胶材料制作成0.1 cm厚的透明薄膜,结合硅橡胶材料的泊松比以及弹性模量,应用三维有限元分析软件对数据进行处理,模拟硅橡胶受到牵张应变后产生的形变;通过MTT方法比较细胞在硅橡胶和标准培养板上的生长情况,并采取体外皮下包埋实验验证硅橡胶材料是否具有生物学毒性。**结果** 在对材料加载0.5%~20%的过程中,有效应变范围集中在硅橡胶膜的中心区域,约占总面积的90%;同时,硅橡胶材料虽然在生物相容性方面与标准培养板存在一定差异,但其本身无生物学毒性。**结论** 这种自制的硅橡胶细胞载体表面应力分布良好,生物相容性尚可满足细胞培养,但表面需进一步改善,可满足细胞的牵张应变实验。

关键词: 硅橡胶; 有限元方法; 应变; 应力分布; 弹性模量; 生物相容性

中图分类号: R 3 **文献标志码:** A

Stress analysis and biocompatibility research on a cell carrier with silicone rubber membrane

MA Xin-long^{1,2}, LI Shuang^{2*}, FU Xin¹, SUN Xiao-Lei¹, LI Xiu-lan¹, ZHANG Yang¹,GUO Yue¹, LI Zhi-jun² (1. Department of Orthopaedics, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China;

2. Department of Orthopaedics, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

Abstract: Objective To report a self-developed cell carrier made of silicone rubber membrane, and to calculate the strain distributions on the membrane and analyze biocompatibility of the silicone rubber by three-dimensional (3D) finite element method (FEM) so as to make a comprehensive evaluation on this silicon rubber membrane and provide theoretical basis for cellular research under stress stimulation. **Methods** The silicon rubber was made into a membrane with the thickness of 0.1 cm. Based on elastic modulus and Poisson's ratio of the silicone rubber membrane, 3D FEM was used to simulate the deformation of the membrane induced by the stretch stress. MTT method was used to compare the growing situation of cells cultured on the silicone membranes and in standard plastic plates, respectively. Embedding experiment was also conducted to find out whether the material had biological toxicity or not. **Results** Under the loading of 0.5%~20% strain, the area with effective strain was in the center of the membrane, accounting for 90% of the total area. There still existed some differences in biocompatibility between the silicon rubber membrane and standard plastic plate, but the material itself showed no toxicity. **Conclusions** Stress distributions on the surface of this self-developed silicon rubber membrane and its biocompatibility were generally acceptable for cell culture, but its surface should be further improved to fit for cell stress experiment.

Key words: Silicon rubber; Finite element method; Strain; Stress distribution; Elastic modulus; Biocompatibility

收稿日期:2011-05-20; 修回日期:2011-07-26

基金项目:国家青年自然科学基金项目(30801168),天津市卫生局自筹项目(2011KZ57)。

通讯作者:孙晓雷, E-mail: sunden815@yahoo.cn。

* 为第一共同作者

近年来,随着组织工程学和细胞工程学的发展,细胞生物力学已经成为了现代生物力学的一个前沿学科。生命是一个拥有力学性能的整体,生命体中的器官、组织到细胞的生理活动都在一定力学环境下进行,细胞的形态结构、增殖分化及功能都与细胞所处的力学环境密切相关,并时刻受到力学因素的影响。细胞生物力学的目的正是通过对细胞生长的环境施加各种力学因素,观察细胞对力学刺激的反应,研究在机械力学信号作用下细胞及各细胞器的生物学效应变化、生物化学信号转导途径及其机理^[1-4]。目前常见的体外细胞力学实验方法主要有单细胞加载,流体剪切应力、基底应变、压应力、离心力和磁力加载技术等。其中,基底应变加载技术主要有矩形基底拉伸法、圆形基底变形法和4点弯曲梁加载法3种^[5]。矩形基底拉伸法模仿生理条件下基质的形变,通过不同方法牵拉培养基膜,使黏附在基膜上的细胞被动拉伸^[6]。由于该方法简便,控制形变程度精确,在平面培养体系中可以最大限度接近体内力学环境,目前被认为是一种最佳应变加载方式。因此,本文应用此方法对细胞实施力学加载;但由于此方法对基底膜要求较高,需要基底膜无色透明、拥有良好的弹性和生物相容性。

在前期实验中,本课题组找到了一种硅橡胶材料;与其他硅橡胶材料相比,他除了具备硅橡胶材料弹性好的特点外,自身还具有制备方便、透明性好、无毒等特点。在此基础之上,测定此硅橡胶膜的弹性模量以及泊松比,并将硅橡胶材料制作成2 cm × 4 cm × 0.1 cm的膜片,对应变在载体材料上的分布规律以及细胞学相容性进行全面的分析评价,为矩形基底拉伸法中细胞承受应变情况提供参考数据,对开展细胞力学的深入研究具有一定的实践意义。

1 实验装置与方法

1.1 主要实验装置与试剂

Sylgard184 硅橡胶(Dow Corning公司,美国),生物力学材料动态力学性能测试仪器(Endura TEL ELF 3 200)及其配套的Wintest生物力学测试软件(Bose公司,美国),相差显微镜(Nikon公司,日本),3月龄新西兰白兔(天津市天津医院动物室提供),第3代兔成纤维细胞(天津市天津医院细胞工程室提供),MTT(Sigma公司,美国),胎牛血清

(Gibco公司,美国),DMEM(Gibco公司,美国)。

1.2 细胞加载系统

本实验采用美国Boss公司BioDynamic细胞应力加载系统。该系统以弹性基底膜(Dow Corning公司)作为载体,配合EletroForce系统对细胞进行应力加载,同时由Bose PCI和Win Testing系统联合控制力学参数,如持续时间、拉伸长度、拉伸频率等,使弹性基底膜产生精准变形,使培养在上面的细胞同时受到拉伸形变的作用。储液罐置于CO₂培养箱内,由管道系统与应力加载装置相连;蠕动泵以一定速度运转,使培养基在整个培养体系中循环,以保证CO₂浓度与温度的恒定(见图1)。

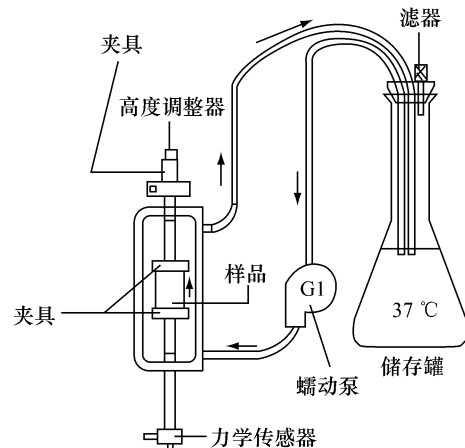


图1 细胞应变加载系统示意图

Fig.1 Schematic diagram of the cell strain loading system

1.3 硅橡胶膜的制备

硅橡胶液体及其固化液以10:1的比例混合,均匀搅拌后放入离心机,以2 000 r/min速度离心10 min充分发泡,发泡后的硅橡胶其灌入自制的塑料模具之中。灌注好的模具常温静置2周后脱模。为了与Endura TEL ELF 3 200生物力学材料动态力学性能测试仪相匹配,以自制卡具固定膜片上下两端,保留卡具之间2 cm长度。参考并改进国外学者的处理方法^[7],肥皂水小心清洁膜片表面后,将制作好的膜片放入75%酒精内浸泡3 d,每日更换一次酒精,以去除包含于硅橡胶膜内残余的有机溶剂。将制备好的硅橡胶膜片置入75%酒精中保存备用。

1.4 细胞应变装置中硅橡胶膜的应变分析

应用ANSYS 11.0对硅橡胶膜表面应变及位移

分布进行分析。基于以下假设进行有限元网格划分:(1) 材料为线性弹性材料,与 Hooke 定律相符;(2) 诱导位移很小,忽略刚性变化;(3) 载荷无突变,忽略动态效果。

根据硅橡胶膜生产公司所提供的该材料特性参数和对该材料进行的试验和计算所得,确定该硅橡胶膜的弹性模量 $E = 6.20 \text{ MPa}$,泊松比 $\nu = 0.49$ 。实验分析对象为一张规则硅橡胶薄膜,同时加载装置亦是规则的矩形卡具。故按照有限元分析的轴对称原则建模,并以 SOLID 95 划分为 2 310 个 6 面体网格单元。由于拉伸过程中硅橡胶膜上下两端被卡具牢固固定,因此,硅橡胶模型的上、下两表面均设为固定约束点。其中下表面 x, y, z 3 个方向位移均为 0,上表面 x, z 方向位移为 0, y 方向位移分别设定为 0.5%、1%、2%、5%、10%、20%,即 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2, 4 mm。

1.5 硅橡胶膜的生物相容性测试

1.5.1 细胞学相容性测试 将此 24 孔板 (Corning 公司,美国) 分为硅橡胶和标准培养板 2 个组。取制备好的硅橡胶膜,修剪成 24 孔板大小的圆片,121℃ 高压蒸汽灭菌后置入 24 孔板底,保证其与底面紧密贴合。制作好的硅橡胶膜培养板以含有 10% 血清的培养基包被,并放置 24 h 烘干。取 P3 代家兔成纤维细胞,用含 10% FBS 的 DMEM 培养基稀释成细胞密度为 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 细胞悬液,充分混匀,每孔内加入悬液 1 mL,3 d 更换一次培养液。分别于 2、4、6、8 d 相差显微镜下观察并记录细胞形态。每孔加入浓度 5 g/L 的 MTT 50 μL ,继续放在

37℃ 条件下培养 4 h,吸去原培养液,加入二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)。将 24 孔板中的液体移入 96 孔板中,每个时间点每组设 8 个副孔,在酶标仪上测定各孔光吸收值 (OD 值),绘制并比较细胞在硅橡胶膜和标准培养板上的生长曲线。

1.5.2 体内毒性实验 随机选取硅橡胶膜材料,剪成 $0.1 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 小块,121℃ 蒸汽灭菌后备用。另取大耳白兔 6 只,随机分为实验组和对照组。无菌条件下将硅橡胶材料植入背部皮下,缝合切口,同时以手术用无菌丝线植入皮下作为对照组。每只大耳白兔植入 6 块植入物,分别于手术后 3、7、14 d 处死,将材料以及周围组织标本取出,观察植入部位皮肤是否出现红肿渗出,通过病理学方法观察炎症细胞浸润情况。

1.6 统计学方法

使用 SPSS 17.0 软件包对数据进行分析处理。应用线性回归方法确定材料泊松比;检验各组数据方差齐性,采用 t 检验比较细胞在培养板与硅橡胶膜上生长的 MTT 差异以及两组间的差异。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 硅橡胶膜片的外观

制作完成的硅橡胶膜片,性质均匀,表面无色透明,有较强的弹性,无刺激性气味 (见图 2(a))。光学显微镜下表面平整光滑,对细胞观察无影响 (见图 2(b))。

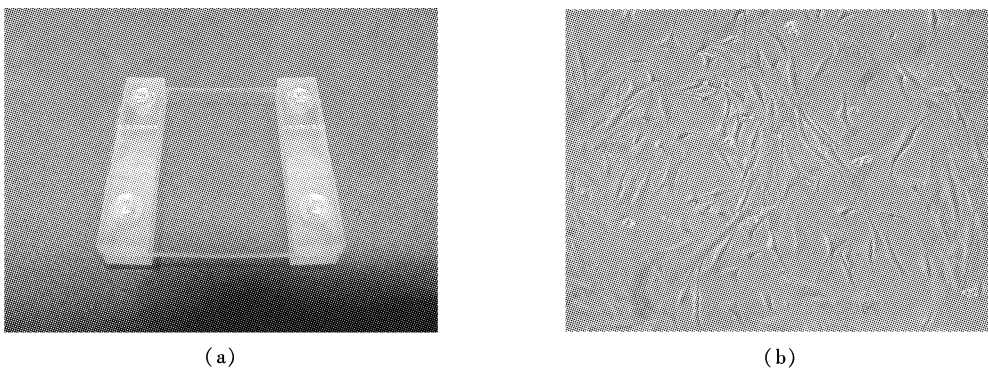


图2 硅橡胶细胞载体外观及其显微镜下照片 (a) 硅橡胶膜及其卡具大体照片, (b) 硅橡胶膜上生长的 P3 成纤维细胞相差显微镜下照片 ($\times 100$)

Fig.2 Appliance and microscope photos of the silicon rubber cell carrier (a) Silicon rubber membrane and its chucking appliance, (b) Fibroblasts growing on the silicon rubber membrane observed by a contrast phase microscope ($\times 100$)

2.2 硅橡胶膜的应变分析

通过 ANSYS 11.0 软件对硅橡胶薄膜进行位移和应变分析, 得出各应变组硅橡胶膜上的应变和位移分布情况, 同时得到各组最大 von Mises 应变值、最小 von Mises 应变值以及硅橡胶膜上处于有效应变范围内(预加载应变 \pm 预加载应变 $\times 20\%$) 的面积。

ANSYS 软件对位移及应变分析结果如下: 根据颜色指示条, 蓝色为位移及应变最小, 红色为位移及应变最大。中间颜色渐变, 表示位移递增。所加载的应变类型为 von Mises 应变。各形变组在硅橡胶膜表面的应变分布情况均相同, 以 1% 形变组为例

(见图 3), 有效应变范围占总面积 91% 左右, 主要集中于中央区域, 此范围符合细胞接种区域; 上下和左右边缘部分有小面积低应变区域, 由于此范围较小(2% 左右), 且无法接种细胞, 故认为不对细胞生物力学实验结果构成影响; 四角有小面积高应变区域分布(7% 左右), 此部位亦不是细胞种植的有效区域, 但提示在此应变加载模式下, 过大的形变有可能使硅橡胶膜在此处发生撕裂。 x 轴方向应变绝对值较小, 约为有效应变的 5% ~ 10%, 而有效应变区域内的应变主要由 y 轴方向应变构成, 其中最合适的应变区域约为总面积的 88%。

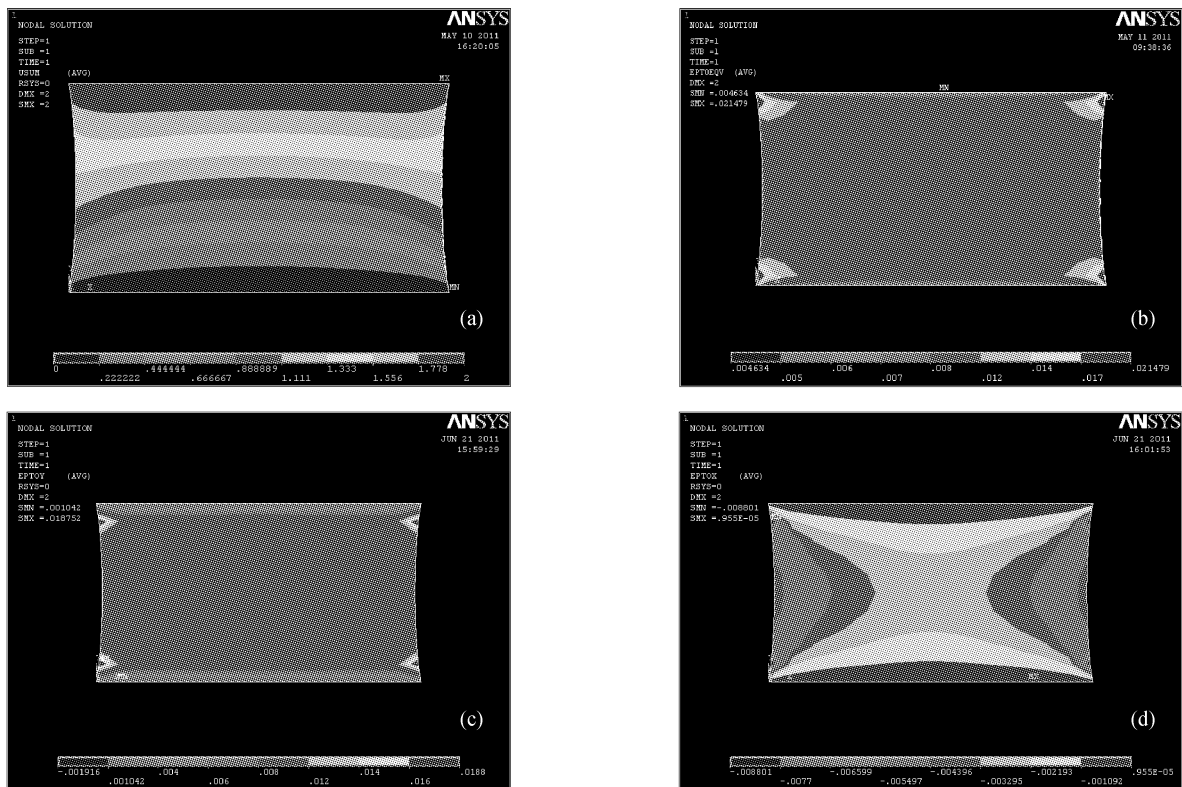


图 3 1% 形变加载时硅橡胶膜三维有限元分析 (a) 位移分布情况, (b) 应变分布情况, 图中最大部分绿色面积微应变为 8 000 ~ 12 000 (有效应变区域), (c) y 轴方向应变情况, 图中最大部分绿色微应变为 8 000 ~ 12 000 (有效应变区域), (d) x 轴方向应变情况

Fig. 3 Three-dimensional finite element analysis of the silicon rubber membrane loaded with strain of 1% (a) Displacement profile, (b) Strain profile, the largest green area was in range of the micro-strain of 8 000 ~ 12 000 (effective strain area), (c) Strain profile of y -axis, the largest green area was in range of the micro-strain of 8 000 ~ 12 000 (effect strain area), (d) Strain profile of x -axis.

2.3 生物相容性实验

2.3.1 细胞学相容性实验

刚接种的成纤维细胞呈圆形, 在材料内均匀分布, 24 h 后完成贴壁。贴附于硅橡胶膜与培养板上的细胞形态上无明显差异, 实验组与对照组生长曲线呈现标准的生长曲线

形状, 但两者 OD 值存在统计学差异 ($P < 0.05$, 见图 4)。

2.3.2 体内生物相容性实验结果

实验组与对照组组织病理学表现无明显差异: 皮下包埋实验 3 d, 组织中可见少量炎性细胞浸润; 7 d 时, 炎性反应减

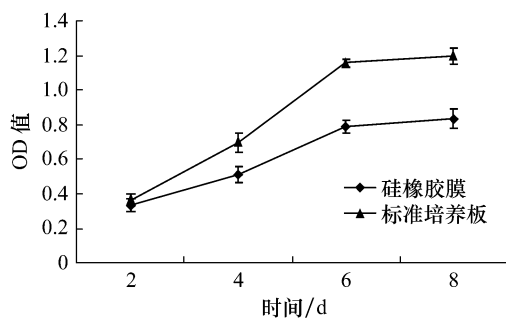


图4 成纤维细胞在标准培养板和硅橡胶膜上增殖活性比较

Fig. 4 Comparison of fibroblasts proliferation on the silicon rubber membrane and standard plate

轻,同时出现少量多核巨细胞反应;14 d时,无炎症细胞出现,包埋组织周围有少量纤维化组织形成。病理结果提示,可认为硅橡胶膜本身无组织学毒性。

3 讨论

细胞的生长、增殖受到多种环境因素的共同作用。除细胞周围温度、PH值、以及一些细胞生长因子等影响因素外,机械刺激对细胞的体外生长也有重要的调节作用,具体表现为对细胞增殖、凋亡以及细胞因子表达的干预作用等。基于上述原理,国内外学者对力学刺激对细胞的影响进行了大量的研究,其中以对成骨细胞研究的文献报道最为丰富^[8-9]。力学刺激的方式多样,其中循环牵张应力加载作为最重要的应力加载方式之一,被学者们广泛接受。其方法主要是将细胞种植于可变形的弹性载体上,通过对载体施加一定程度的形变,使细胞被动形变,达到刺激细胞的效果。当细胞受到机械刺激后,细胞骨架系统在力学信号的感受及传导中发挥着重要的作用,通过细胞外基质-整合素-细胞骨架复合体的相互作用,完成机械信号的细胞内传导^[10]。因此,在整个实验过程中,对弹性载体性能的分析就成为了首要问题。

基于细胞生物力学实验载体对所需材料的透明度、弹性以及细胞相容性3个原则,本实验先后进行了以下工作。首先,对硅橡胶材料进行了塑型,并参照文献^[7]进行了脱毒和灭菌处理。实验结果表明,硅橡胶材料在75%酒精浸泡以及121℃的蒸汽灭菌后,透明度良好,不影响显微镜下细胞观察。此耐高

温特性降低了材料的灭菌难度,为硅橡胶材料作为载体培养细胞提供了前提。结合Dow Corning公司提供的材料弹性模量以及之前实验中测定的材料泊松比,应用ANSYS 11.0软件模拟材料受力后的位移和应变分布情况对材料进行三维有限元分析。从结果可以看出,各形变组在硅橡胶膜表面的应变分布情况均相同,其中有效应变范围主要集中于中央区域,y轴方向有效应变区域略小,但与总应变分布相似,且分布范围符合细胞接种范围。同时,x轴方向应变约为总应变5%~10%,在实际加载过程中可以忽略不计,提示载体上的应变可认为是y轴方向应变,载体上的细胞可全部受到相同方向上的力学刺激,是一种有效的“单轴”加载过程。此单轴应变加载过程对减少混杂机械刺激因素、研究力学刺激下细胞骨架和极性的改变都有着十分重要意义,也是单轴牵张应变的优势所在。

由于体外培养的细胞组织来源不同,细胞适应应变的强度也不相同。如体外培养的成骨细胞的有效微应变刺激2 000~4 000,而相同条件下的软骨或纤维环细胞可承受20%左右的循环牵张形变,相当于微应变200 000左右^[11-12]。因此,在系统精度可以达到的前提下,硅橡胶膜材料完全可以达到机械牵张应变加载要求。值得注意的是,任何有限元模型都是对实际情况的近似^[13],且鉴于实际条件复杂性,不可能完全模拟。因此,利用有限元模型得出的计算结果还需与实际情况进行比较,以起到相辅相成的作用。在这种对硅橡胶实施牵张作用模型下,硅橡胶膜可产生较精确的形变,并将其传递给细胞。但是,如何实时和精确地测量细胞在加载过程中所受到的应变仍然是将要进行的重要工作。

由于Sylgard184硅橡胶是一种工业用材料,生物学毒性的不确切难免造成对细胞生长状态的影响。本实验采用多次酒精浸泡、冲洗以及高温蒸汽的方法,尽量去除其表面和内部残留的有机物质,并保证表面的平整光洁。通过经典MTT方法对经过处理的硅橡胶材料的细胞学相容性进行分析,在2、4、6、8 d的时间点上,细胞在硅橡胶上的生长情况和标准细胞培养板上的生长情况存在差异($P < 0.05$),而种植在硅橡胶膜上的成纤维细胞MTT曲线表现出正常趋势,存在正常的对数增长期以及平台期。其原因可能是:(1)硅橡胶膜本身不具有细

胞毒性,但由于材料表面疏水等原因,无法达到标准培养板的培养效果;(2) 在应用 MTT 法对硅橡胶膜生物相容性进行评估的过程中,发现硅橡胶膜对 MTT 有一定的亲和力,透明的硅橡胶薄膜可被 MTT 染成均匀淡紫色,这可能在一定范围内影响了实验结果。在体外实验中,将硅橡胶膜种植于白兔皮下,以 3、7 和 14 d 为固定时间点观察其与对照组的大体与病理变化情况,病理学观察未见急性期炎症反应,认为此硅橡胶材料不具有生物学毒性。

郭志良等^[14]将大鼠纤维环细胞种植于硅橡胶膜上,并观察其形态变化以及细胞产物表达情况,发现种植于硅橡胶膜上的纤维环细胞表型特征无改变。本文认为硅橡胶材料虽然在生物相容性方面与标准培养板存在一定差异,但不影响其作为一种细胞生物力学载体。因此,需要寻找一种表面处理方法改善其表面性质。硅橡胶材料的表面改良方法很多,在这里不做赘述。本实验中应用含有 10% FBS 的培养基对材料进行包被,并进行过夜干燥处理,使硅橡胶膜的培养效果有了显著改善,但仍然不可能达到标准培养板的培养效果。关于材料的表面处理问题,尚待进一步实验论证。

综上所述,用 Dow Corning 公司生产的硅橡胶材料制作而成的厚 0.1 cm 的硅橡胶薄膜力学性质良好,有效应变面积分布区域占整个膜表面 90% 以上,且无细胞毒性,细胞生物学相容性尚可,但仍有一定改良空间,材料本身透明且不影响细胞观察。因此,认为此硅橡胶膜是细胞生物力学实验的良好载体介质,其加载系统可为细胞生物力学实验提供良好的条件。

参考文献:

- [1] Jones DB, Nolte H, Scholubbers JG, *et al.* Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells [J]. *Bio Mater*, 1991, 12(2): 101-110.
- [2] Leung DY, Glagov S, Mathews MB. A new in vitro system for studying cell response to mechanical stimulation. Different effects of cyclic stretching and agitation on smooth muscle cell biosynthesis [J]. *Exp Cell Res*, 1977, 109(2): 285-298.
- [3] Gilbert JA, Weinhold PS, Banas AJ, *et al.* Strain profiles for circular cell culture plates containing flexible surfaces employed to mechanically deform cells in vitro [J]. *J Biomech*, 1994, 27(9): 1169-1177.
- [4] 冯雪,陈富林,程兵,等. 培养细胞机械牵拉加载系统的研制 [J]. *临床口腔医学杂志*, 2003, 19(7): 387-389.
- [5] 黎润光, 邵景范, 魏明发. 机械牵张应力对成骨细胞的影响研究进展 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2006, 14(6): 457-460.
- [6] 孙晓雷, 马剑雄, 马信龙. 成骨细胞应力加载方式及生物力学特性的研究进展 [J]. *中国骨与关节外科*, 2010, 3(3): 250-254.
- [7] Kurpinski K, Li S. Mechanical stimulation of stem cells using cyclic uniaxial strain [J]. *J Vis Exp*, 2007, 6: 242.
- [8] 李菲菲, 丁寅, 冯雪, 等. 机械牵张应力刺激成骨细胞的差异蛋白质组学研究 [J]. *医用生物力学*, 2010, 25(6): 406-411. Li FF, Ding Y, Feng X, *et al.* Differential proteomic analysis on osteoblasts stimulated by mechanical strain [J]. *J Med Biomech*, 2010, 25(6): 406-411.
- [9] 李晖, 张晓玲, 沈刚, 等. 周期性张应变作用下成骨细胞凋亡的体外研究 [J]. *医用生物力学*, 2009, 24(3): 223-227. Li H, Zhang XL, Shen G, *et al.* Study on osteoblast apoptosis in response to mechanical stretch in vitro [J]. *J Med Biomech*, 2009, 24(3): 223-227.
- [10] 张鹏, 房兵, 江凌勇. 机械刺激对成骨细胞骨架的影响 [J]. *医用生物力学*, 2011, 26(1): 87-91. Zhang P, Fang B, Jiang LY. Effect of mechanical stimulation on osteoblast cytoskeleton [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(1): 87-91.
- [11] 李稚君, 马信龙, 马剑雄, 等. 周期性前张力对成骨细胞细胞骨架影响的实验研究 [J]. *国际生物医学工程杂志*, 2010, 33(6): 347-350.
- [12] Hamish T, Judith A, Millward-Sadler SJ. The response of human annulus fibrosus cells to cyclic tensile strain is frequency-dependent and altered with disc degeneration [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(11): 3385-3394.
- [13] 仲维广, 胥春, 米红林. 细胞应变装置中硅橡胶膜的应力分析 [J]. *医用生物力学*, 2007, 22(2): 121-126. Zhong WG, Xu C, Mi HL. Stress analysis of silastic membrane in dynamic strain cell unit [J]. *J Med Biomech*, 2007, 22(2): 121-126.
- [14] 郭志良, 周跃, 成敏. 种植于硅橡胶膜上的大鼠纤维环细胞的表型特征研究 [J]. *第四军医大学学报*, 2006, 27(13): 1169-1172.