

DOI: 10.7652/xjtuxb201712021

酶交联明胶水凝胶性能研究及仿生微流道制备

陈若梦, 王宏, 黄亚江, 刘亚雄, 贺健康, 李涤尘
(西安交通大学机械制造系统工程国家重点实验室, 710049, 西安)

摘要: 针对当前水凝胶构建实质性功能器官存在制备血管网络困难的问题, 采用了转谷氨酰胺酶(mTG 酶)交联明胶构建明胶水凝胶圆形仿生微流道的方法。研究了明胶水凝胶的力学性能、成形性能及生物性能与明胶浓度的关系, 提出了明胶水凝胶构建微流道结构的工艺条件, 评价了微流道构建工艺的成型精度、力学性能和内皮化功能。结果表明: 随着水凝胶浓度的提高, 水凝胶的力学性能成线性增加, 微结构的成型性能也逐步改善, 但是浓度过高生物性能反而降低, 明胶质量浓度为 0.1 g/mL 的水凝胶综合性能相对较好, 可用于构建圆形仿生微流道; 采用的微流道成型工艺保持了原有水凝胶的力学性能, 但是存在一定的成型误差, 细胞在微流道内分布均匀, 实现了微流道的内皮化。通过研究不同浓度的酶交联明胶水凝胶, 制备的仿生微流道有望用于实质性功能器官的仿生重建。

关键词: 实质性功能器官; 明胶; 转谷氨酰胺酶; 水凝胶; 微流道

中图分类号: Q811.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-987X(2017)12-0143-07

Properties of Enzymatically Crosslinked Gelatin and Fabrication of Bio-Microchannel

CHEN Ruomeng, WANG Hong, HUANG Yajiang, LIU Yaxiong, HE Jiankang, LI Dichen
(State Key Laboratory for Manufacturing Systems Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract: A new strategy is adopted to construct the hydrogel microchannel with the enzymatically-crosslinked gelatin by evaluating the different concentration gelatin hydrogel, which aims to solve the difficulty of fabricating circular microchannel by soft hydrogel. The relationship of the gelatin properties (mechanical, forming and biological) with its concentration is revealed and discussed, and the molding process of gelatin hydrogel microchannel is proposed. The structural, mechanical and endothelialization properties of gelatin hydrogel microchannel are also studied. The experimental results indicate that with the increasing gelatin concentration, the mechanical property and microstructure replication property of the composite hydrogels are gradually improved, however, superior concentration causes lower biological performance. Hence, the hydrogel with 0.1 g/mL gelatin is chosen as the optimal composition to build circular microchannel. The approach for fabricating microchannel retains the original mechanical properties of the hydrogel, although certain error exists in the forming process from characterizing morphology and the dimension of the microchannel. Besides, the microchannel gelatin facilitates attaching and spreading of human umbilical endothelial cells (HUVECs) to

form a uniform endothelialized layer around the channel surface. Following the evaluation of different concentrations of enzymatically crosslinked gelatin hydrogel, the biomimetic microchannel can be expected to apply to reconstruction of substantive functional organs.

Keywords: substantive functional organs; gelatin; mTG; hydrogel; microchannel

近年来,随着生命科学、材料科学和工程科学的交叉发展,已在多种组织、器官体外再造的研究方面取得了突破性进展,但是构建具有实质性功能的器官是当今组织工程研究领域中的难点之一。这是因为实质性功能器官具有复杂的空间结构和生理功能,使得构建实质性功能器官的研究面临严峻挑战。

构建实质性功能器官对构建材料的生物学特性要求很高。目前研究认为,构建实质性器官的细胞只有在接近于自然细胞外基质的环境下,才能保证正常的形态和功能表达。天然基质材料来源于生物本身,具有生物相容性好、毒性小、易降解且降解产物易被人体吸收、不产生炎症反应等优点^[1]。明胶是天然机制材料胶原蛋白的水解产物,其成分与体内的细胞外基质相似,但是明胶本身是温度交联,在人体生理温度 37℃ 环境中不能形成稳定的水凝胶。化学交联剂戊二醛通常被用于明胶水凝胶的制备^[2],但是戊二醛有潜在毒性,不具有生物相容性。此外还有光交联明胶^[3],但是成型性能仍不理想。

构建具有实质功能的器官,血管化是其再造移植成功与否的至关因素。从以往研究可以看出,没有内在的血管网络,组织工程构建的仿生组织厚度仅限于几百微米^[4],这远远不足以模拟替换自然功能性器官。随着先进制造技术的发展和应用,在具有生物相容性的水凝胶中嵌入立体微流道网络成为可能。

本文重点研究了酶交联明胶,对其力学性能、成型性能和生物性能进行了评价,同时对酶交联明胶在微流道成型方面的应用进行了探索,证明了酶交联明胶可成型微流道结构,并且有形成血管的趋势,在实质性功能器官制造方面具有很大的应用潜力。

1 酶交联明胶水凝胶制备及性能研究

1.1 酶交联明胶水凝胶的制备

酶交联明胶水溶液是采用明胶溶液(Sigma 公司)和转谷氨酰胺酶溶液(mTG 酶, Ajinomoto 公司)按一定比例混合制成的。明胶为温敏型材料,明胶粉末需在 60℃ 磷酸缓冲盐(PBS)溶液中完全溶解,将制成的明胶溶液室温放置直至温度降至 30℃ 以下,同样使用 PBS 溶液配制 mTG 酶,保证 mTG

酶与明胶的质量比为 1:10。将酶溶液与明胶溶液均匀混合,倒入相应的容器或者模具中,放置于 37℃ 环境中 6 h 以上,形成稳定水凝胶。

本文基于 mTG 酶与明胶质量比恒定的原则,制备了不同质量浓度 0.05、0.1、0.2 g/mL 的酶交联明胶水凝胶,比较其力学性能、微结构成型性能及生物性能,并以这些性能评价为基础选择最优配比。

1.2 水凝胶力学性能测试

使用 ETM103A 型微机控制万能试验机测试水凝胶的力学性能。采用直径为 10 mm、高为 10 mm 的圆柱形硅橡胶模具作为研究水凝胶力学性能的标准模具。测试之前将制成的 3 种质量浓度的水凝胶在 PBS 溶液中浸泡 24 h,试验机的压缩速度为 5 mm/min,每种支架测试 4 个样品,绘制出应力-应变曲线,得到平均压缩模量。

1.3 水凝胶微结构成型测试

实验中采用硅橡胶模具作为研究水凝胶微结构成型性能的标准模具。硅胶模具在使用前应进行等离子清洗,以改善其亲水性,便于溶液灌注。然后将配置好的不同浓度的明胶、mTG 酶混合溶液分别灌注到硅胶模具中,在 4℃ 环境下静置 30 min 后将水凝胶脱模,之后将脱模的水凝胶放置于 37℃ 环境中 6 h 成型,由此得到不同质量浓度的具有微结构的水凝胶。

1.4 细胞相容性测试

为了评价酶交联明胶水凝胶的浓度对细胞相容性的影响,将密度为 10^5 /mL 的人脐静脉内皮细胞(HUVECs, CTCC-545)种植于成型后的水凝胶表面。然后使用 DMEM/F12 培养液(含体积分数为 10% 的胎牛血清、0.2% 的青霉素和链霉素),置于细胞培养箱中进行培养,培养液每天更换一次。在第 1、3、5 天使用细胞增殖试剂盒(CCK-8, 日本同仁公司)进行细胞增殖情况的检测。

2 微流道制备及性能评价

2.1 制备工艺

基于上述对不同浓度酶交联明胶水凝胶性能的评价,确定制备具有仿生微流道的酶交联明胶水凝胶质量浓度,微流道制备的主要工艺如图 1 所示。

利用光固化和微负型技术制备硅橡胶模具,在硅橡胶模具使用前进行等离子清洗,以改善其亲水性;将配制的新鲜明胶和 mTG 酶溶液灌注到硅橡胶模具中,室温放置 15 min 后,在 4℃ 环境中冷却 30 min;将半交联的明胶仔细脱模,组装 2 个单层水凝胶形成完整微流道的水凝胶,放置于 37℃ 中 6 h,经完全化学交联作用形成稳定水凝胶微流道。本文制备的水凝胶微流道的直径具有 3 个级别,设计值分别为:1 级 952 μm,2 级 756 μm,3 级 600 μm。

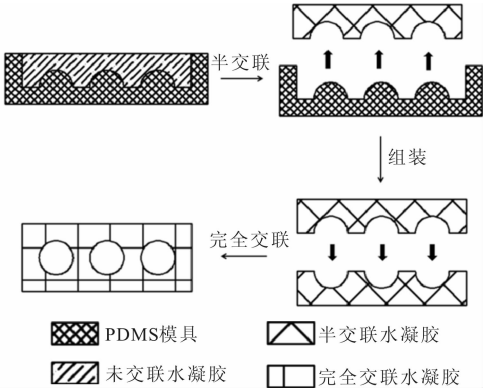


图 1 仿生微流道制备工艺示意图

2.2 成型精度评价

明胶水凝胶仿生微流道是由两个单层支架组装而成,对仿生微流道成型精度的评价主要是对流通截面形状进行评价。评价方法是通过 Micro-CT 对微流道进行扫描重建,分别对 3 个级别尺度的微流道截面图像直径进行测量统计。

2.3 力学性能评价

两个单层水凝胶接触面的结合可靠性是微流道水凝胶制备成功与否的重要评价指标。为了验证结合强度,制备了 2 种水凝胶试件,对照组为高 10 mm、直径 10 mm 的圆柱体试件,实验组为 2 个高 5 mm、直径 10 mm 的圆柱体,采用图 1 所示的工艺方法组装在一起,2 组试件各为 5 个。使用 ETM103A 型微机控制万能试验机测试力学性能。测试之前将两组试件在 PBS 溶液中浸泡 24 h,拉伸速度为 5 mm/min,绘制应力-应变曲线,得到平均抗拉强度。

2.4 内皮化评价

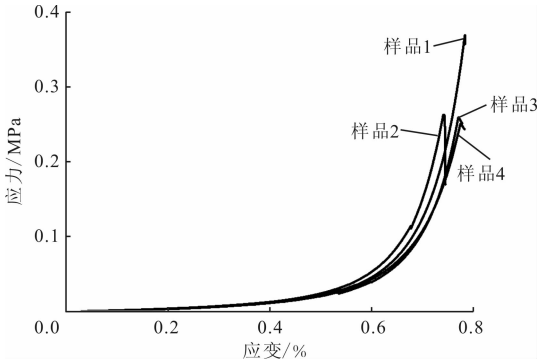
在做微流道内皮化评价之前,需要将水凝胶微流道进行去酶处理,具体方法是水凝胶微流道放置于 65℃ 的无菌去离子水中 30 min,之后使用培养液冲洗,过夜浸泡。明胶水凝胶微流道血管化的评价是采用在微流道内旋转种植^[5]人体脐静脉血管内皮细胞,细胞内转染了绿色荧光蛋白,可以通过荧光显微镜观察细胞分布情况及生长繁殖状态。

3 实验结果

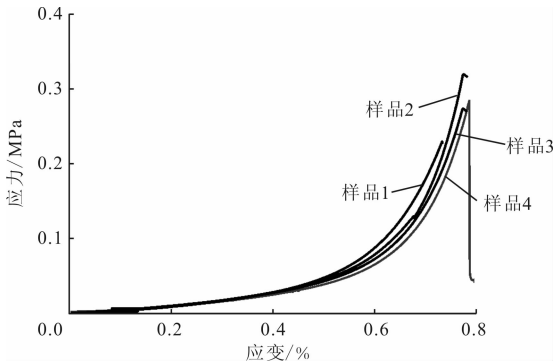
3.1 酶交联明胶水凝胶性能

3.1.1 水凝胶的力学性能 应用 ETM103A 型微机控制万能试验机,测试 3 种浓度水凝胶的力学性能,结果如图 2 所示。图 2a~2c 为 3 种质量浓度水凝胶的应力-应变曲线,曲线光滑表明酶交联水凝胶材料内部成胶均匀,成胶工艺稳定。随着水凝胶的质量浓度从 0.05 g/mL 提高到 0.2 g/mL,水凝胶性能越脆。图 2d 为实验数据统计得出的压缩模量,随着水凝胶质量浓度的成倍增加,压缩模量也近似成倍增加。

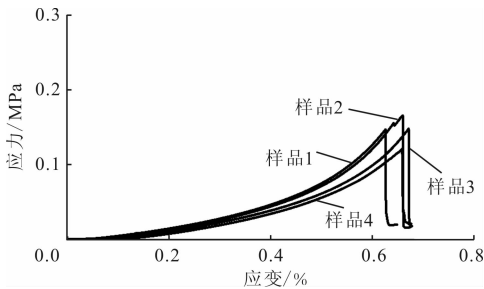
3.1.2 水凝胶的微结构成型性能 在水凝胶微结构成型性能评价试验中,3 种不同质量浓度的水凝胶在如图 3a 所示的硅橡胶模具中均可脱模,说明 3



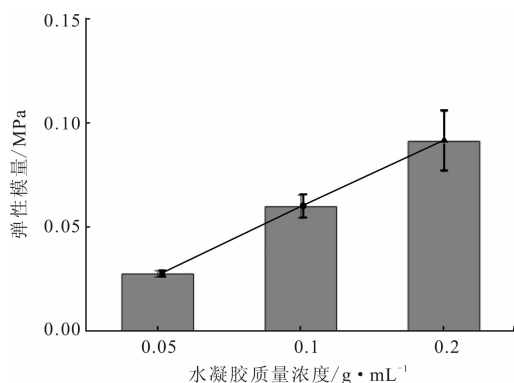
(a) 0.05 g/mL 水凝胶应力-应变曲线



(b) 0.1 g/mL 水凝胶应力-应变曲线



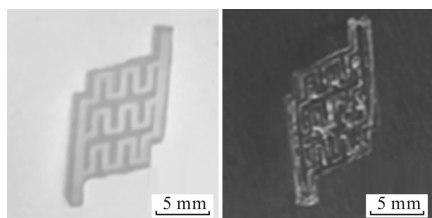
(c) 0.2 g/mL 水凝胶应力-应变曲线



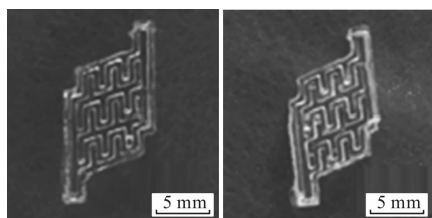
(d) 不同质量浓度水凝胶弹性模量

图2 不同质量浓度水凝胶的力学性能

种浓度水凝胶均有足够的力学性能保证微结构的成形,但是图3b~3d显示出,随着水凝胶质量浓度的提高,水凝胶的成型性能有明显的差异。0.05 g/mL的水凝胶虽然可以成型微结构,但是微结构轮廓相对不够清晰,0.1 g/mL和0.2 g/mL的水凝胶可以完全复型出硅橡胶模具中的微结构,具有良好的成型性能。



(a) 硅橡胶模具 (b) 0.05 g/mL 水凝胶



(c) 0.1 g/mL 水凝胶 (d) 0.2 g/mL 水凝胶

图3 不同质量浓度水凝胶的成型性能

3.1.3 水凝胶的生物性能 采用检测细胞增殖的方法,测试细胞在明胶水凝胶表面的生长增殖情况。如图4所示,测试质量浓度分别为0.05、0.1和0.2 g/mL的明胶水凝胶,吸光度越高说明细胞活性越好。从细胞培养一天的实验结果可看出,3种浓度水凝胶细胞数量相近没有明显差异。细胞培养到第3天,3种浓度的水凝胶细胞数量均有较大幅度的增长,同时也有了明显差异,随着水凝胶浓度的增大,细胞增殖速度越快。直至细胞培养第5天,0.05 g/mL和0.2 g/mL的水凝胶细胞无明显增殖,0.1 g/mL

的水凝胶细胞有增殖但增殖速率较第3天减慢,并且细胞量略超出0.2 g/mL质量浓度的水凝胶。

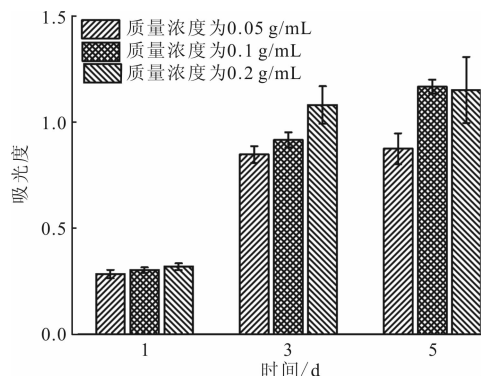
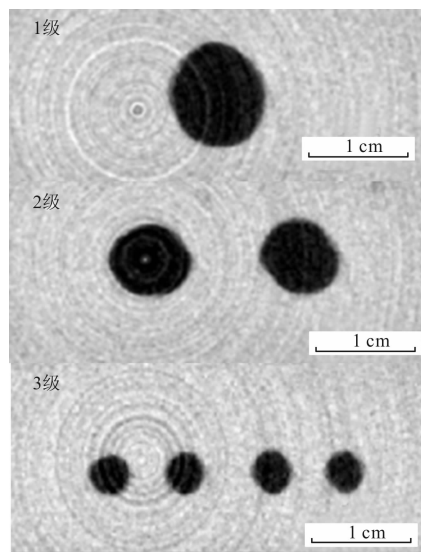


图4 不同质量浓度明胶水凝胶的生物性能

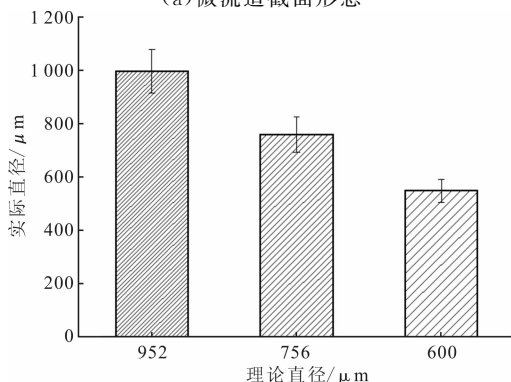
3.2 酶交联明胶水凝胶仿生微流道性能

基于对不同质量浓度酶交联明胶水凝胶性能的综合评价,确定制备具有仿生微流道的酶交联明胶水凝胶质量浓度为0.1 g/mL。

3.2.1 微流道成型精度 通过Micro-CT对微流道进行扫描重建,如图5所示。微流道截面呈近似



(a) 微流道截面形态

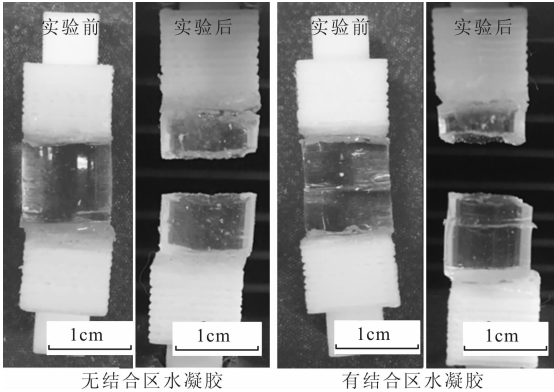


(b) 微流道实际直径统计

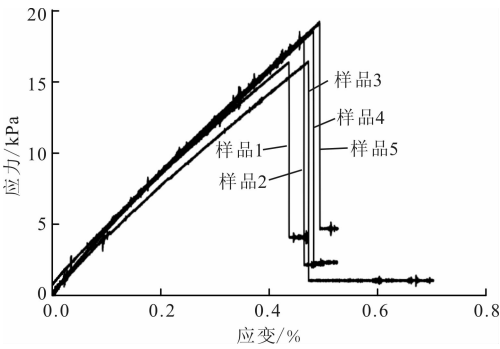
图5 微流道的成型精度

圆状,无明显结合边界存在,经测量微流道截面图像的直径分别 997.5 ± 81.8 、 760 ± 66.8 和 $547.5 \pm 42.7 \mu\text{m}$,对应的设计值为 952、756 和 $600 \mu\text{m}$ 。

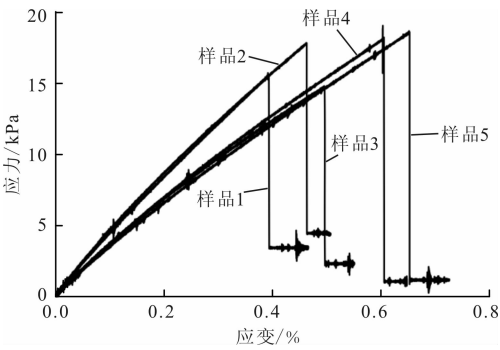
3.2.2 微流道水凝胶力学性能 有结合区和无结合区的水凝胶试件力学测试结果如图 6 所示。图 6a 为两种试件在力学实验前后的对比,可见有结合区的试件其断裂位置与无结合的相似,说明制造工艺的可靠性。图 6b 和图 6c 为两种试件的应力、应变曲线,两者所承受的应力大小相近,无结合区的试件拉断位置相对统一,说明有结合区的试件在一定程度上改变了水凝胶原有的拉伸性能。图 6d 为统计后得到的两种试件的抗拉强度,两者的拉伸强度分别为 41 kPa 和 37 kPa,可见结合区的存在并没有



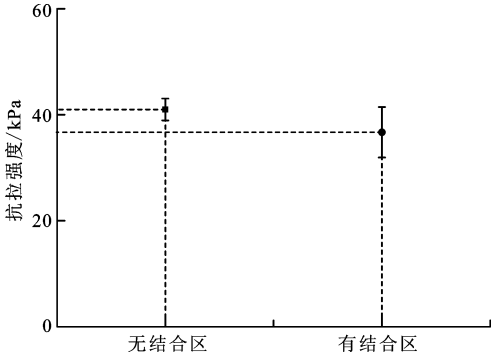
(a)力学实验前后水凝胶对比



(b)无结合区水凝胶应力-应变曲线



(c)有结合区水凝胶应力-应变曲线

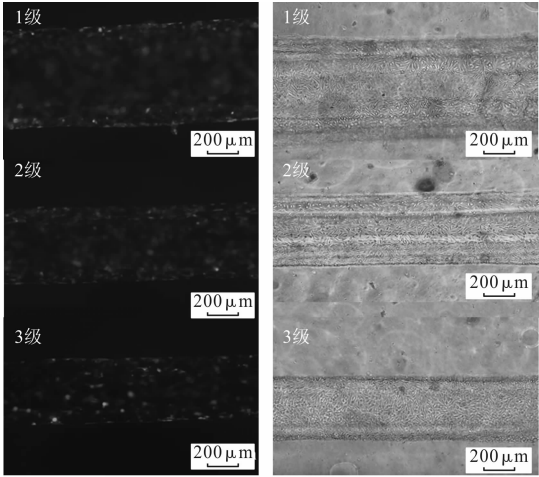


(d)有无结合区水凝胶抗拉强度

图 6 微流道的力学性能

实质影响拉伸强度,进一步说明微流道水凝胶制备工艺的可靠性。

3.2.3 微流道的内皮化 选取明胶水凝胶微流道培养 3 d 为观察时间点,内皮化程度如图 7 所示。由图 7a 可清晰看出,内皮细胞在微流道表面黏附并维持了正常的细胞形态,说明其水凝胶微流道可保持细胞的生存能力并维持正常的细胞表型。将种植在微流道表面的内皮细胞转染绿色荧光,由图 7b 可观察到的荧绿色均匀分布在整个微流道表面,说明微流道可内皮细胞的均匀分布和黏附增殖。



(a)光镜观察 (b)荧光观察

图 7 微流道的内皮化

4 讨论

实质性功能器官再造的关键在于保持器官结构和维持功能细胞特性的表达,因此对构建实质性器官的材料有极其严格的要求。人工合成的聚合物材料由于其优良的机械性能和可加工性,为再造组织提供完整的力学支撑,为细胞间输送营养物质提供了代谢空间。文献[6]用人工合成的聚合物制造出

含有网状相连的管道化支架,表明培养条件下管道化支架为细胞的代谢提供了充足的氧和养分,是工程血管化的雏形。但是,人工合成材料生物相容性较差,与自然组织易产生炎症反应。

自然生物材料主要由细胞外基质蛋白组成,可以支撑细胞的生长,在实质性器官构建和移植方面具有很大的应用价值。胶原是从动物的骨骼、肌腱或韧带中经浸煮、水解等多道工序提炼而来的,具有很好的生物可降解性、弱抗原性和优越的生物相容性,而且显示出良好的无脂界面的穿透性。

文献[7]通过戊二醛与胶原进行交联制造出混合细胞的胶原水凝胶柱体,在第7天时细胞仍然存活,说明其应用于组织工程中的优良性。但是,胶原存在力学性能差、无法成形三维微流道结构的问题,而良好的微流道为组织提供营养供给,对重构组织起着至关重要的作用。明胶形成的水凝胶在微结构和性质上同自然组织相似,可以作为基质供多种细胞生长,并且明胶水凝胶容易塑形。明胶作为温敏型生物材料,在30℃左右会发生溶胶与凝胶转变,化学交联法可有效改善明胶成型缺陷。文献[8]通过使用谷酰胺转氨酶交联明胶,交联产物在大鼠体内植入7d后仍然具有很好的力学强度,说明了酶交联明胶降低了支架植入体内后小分子溢出的危险。文献[9]通过体内和体外实验证明,明胶在内皮细胞黏附和增殖方面与胶原有极其相似的生物性能。

以上研究虽然证明了酶交联明胶水凝胶在实质性器官再造方面的应用潜力,但是均没有对明胶水凝胶的性能进行系统的评价。

在现有的微流道制造工艺中,微压印技术是一个简单灵活的精密加工技术,该技术是通过在模具表面制造可控的供细胞黏附的微米或纳米几何形状,之后通过与预聚物溶液直接接触,期间预聚物发生交联,将预制形状转移到预聚物上^[10]。硅橡胶是最常用的模具材料,可以设计结构多样甚至是空间图样的流道结构^[11-12]。文献[13]在硅橡胶上制造精密的双尺度流道系统,种植内皮细胞形成内皮化血管网络,但是硅橡胶与人体组织相差甚远,虽然实现了内皮化网络但是不能进行体内植入。因此,有研究提出了硅橡胶模具制造和生物材料成型制造相结合的方法。文献[14]提出使用微压印技术,利用丝素蛋白材料,自下而上生成三级尺度的微流道网络。文献[15]利用光刻技术和微压印技术相结合间接制成多尺度树叶脉络硅橡胶负型,在海藻酸钠水凝胶上形成树叶脉络的流道网络,并封装 HepG2 和

HUVEC。文献[16]使用酶交联明胶水凝胶成功进行了微流道的制造。

值得注意的是,以上研究制备的微流道网络截面形态均为矩形,但是人体血管的截面形状为圆形,这种形态上的差异可导致微流道内流体流动特性的改变,从而影响内皮细胞种植的均匀性和功能性的表达^[17]。单尺度圆形微流道可以通过将水凝胶预聚液灌入存在有圆形柱体的模具中,之后将圆柱体去除得到^[18]。但是,如何制备更接近人体血管形状的多尺度圆形微流道网络却存在一定的难度。

本文对酶交联明胶水凝胶的性能进行了较全面的评价。从评价结果可以看出,酶交联明胶水凝胶的力学性能在低浓度下主要呈弹性性质,随着水凝胶浓度的增高,在塑性方面的表现越明显,同时压缩模量与水凝胶浓度成线性关系。不同浓度的酶交联明胶水凝胶均能保证完整的复型,但是随着水凝胶浓度的提高,微结构的保持能力越强,成型性能越好。从生物性能评价结果可看出,在细胞培养初期,随着水凝胶浓度的提高,细胞增殖速度越快,但是在长期培养中,0.2 g/mL 浓度的水凝胶反而抑制了细胞的增殖,但较之 0.05 g/mL 浓度的水凝胶,仍然保持了细胞的高增殖率。综合上述对不同浓度的酶交联明胶水凝胶的评价,本文选用 0.1 g/mL 浓度的酶交联明胶水凝胶构建仿生微流道。

微流道的制造是采用微负型和酶交联明胶成胶机制相结合的工艺,对构建微流道工艺产生的结合面进行了成型精度分析和可靠性力学实验评价。由实验结果可看出,该工艺可较精确地成型仿生微流道,但是结合处的存在使得拉伸应变有所差别。这是因为结合处在一定程度上改变了水凝胶内部分子键的相互作用,但是所承受的载荷没有受到影响,说明结合处并没有实质性影响水凝胶的力学性能。采用旋转细胞种植方法形成的内皮化微流道,由荧光染色可看到均匀的荧绿色分布于微流道表面,说明细胞均匀分布形成内皮层,观察细胞形态,呈正常形态。与文献[16]的细胞培养研究结果相比,本研究所采用的明胶浓度配比和种植方法使细胞分布更加均匀,形态保持更加稳定。本研究细胞培养结果显示,明胶微流道中构建的微环境类似于体内条件,相比传统细胞培养,更有发现和分析细胞新行为和功能的潜能。

5 结 论

酶交联明胶水凝胶在实质功能器官再建方面具

有很大的应用潜力。本文对 3 种浓度的酶交联明胶水凝胶在力学性能、成形性能和生物性能方面进行了综合评价,通过评价发现,随着水凝胶浓度的增加,力学性能和成型性能均有提高,但是在生物性能方面,0.1 g/mL 浓度的酶交联明胶水凝胶适于长期细胞培养,因此选择这个浓度的酶交联明胶进行微流道制备。微流道的制备工艺结合了微负型和酶交联明胶成型机制,并在力学性能、成型精度和血管化方面对微流道进行了评价。结果显示,制造工艺稳定,两个半圆形明胶支架可组成封闭型圆形流道支架,同时可以实现内皮细胞在微流道表面形成类似血管的内皮层。制备的酶交联明胶水凝胶仿生微流道有望用于实质性功能器官的仿生重建。

参考文献:

- [1] ZHANG Yemin, FAN Zhiping, XU Chen, et al. Tough biohydrogels with interpenetrating network structure by bienzymatic crosslinking approach [J]. *European Polymer Journal*, 2015, 72: 717-725.
- [2] CHOI Y S, HONG S R, LEE Y M, et al. Study on gelatin-containing artificial skin: I Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge [J]. *Biomaterials*, 1999, 20: 409-417.
- [3] BILLIET T, GEVAERT E, DE SCHRYVER T, et al. The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(1): 49-62.
- [4] KHALILMARZOUK J F. Allograft replacement of the trachea: experimental synchronous revascularization of composite thyrotracheal transplant [J]. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*, 1993, 105(2): 242.
- [5] BISCHEL L L, YOUNG E W K, MADER B R, et al. Tubeless microfluidic angiogenesis assay with three-dimensional endothelial-lined microvessels [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(5): 1471-1477.
- [6] KIM S S, UTSUNOMIYA H, KOSKI J A, et al. Survival and function of hepatocytes on a novel three-dimensional synthetic biodegradable polymer scaffold with an intrinsic network of channels [J]. *Annals of Surgery*, 1998, 228(1): 8-13.
- [7] NYBERG S L, SHATFORD R A, PAYNE W D, et al. Primary culture of rat hepatocytes entrapped in cylindrical collagen gels: an in vitro system with application to the bioartificial liver: rat hepatocytes cultured in cylindrical collagen gels [J]. *Cytotechnology*, 1992, 10(3): 205-210.
- [8] ITO A, MASE A, TAKIZAWA Y, et al. Transglutaminase-mediated gelatin matrices incorporating cell adhesion factors as a biomaterial for tissue engineering [J]. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2003, 95(2): 196-199.
- [9] NIKKHAH M, ESHAK N, ZORLUTUNA P, et al. Directed endothelial cell morphogenesis in micropatterned gelatin methacrylate hydrogels [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(35): 9009-9018.
- [10] RUIZ S A, CHEN C S. Microcontact printing: a tool to pattern [J]. *Soft Matter*, 2007, 3(2): 168-177.
- [11] RAGHAVAN S, NELSON C M, BARANSKI J D, et al. Geometrically controlled endothelial tubulogenesis in micropatterned gels [J]. *Tissue Engineering: Part A*, 2010, 16(7): 2255-2263.
- [12] TAKEI T, SAKAI S, ONO T, et al. Fabrication of endothelialized tube in collagen gel as starting point for self-developing capillary-like network to construct three-dimensional organs in vitro [J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2006, 95(1): 1-7.
- [13] SHIN M, MATSUDA K, ISHII O, et al. Endothelialized networks with a vascular geometry in microfabricated poly(dimethyl siloxane) [J]. *Biomedical Microdevices*, 2006, 8(3): 271-271.
- [14] 赵倩. 卷裹型肝组织支架的仿生设计制造及生物学评价 [D]. 西安: 西安交通大学, 2011: 32-36.
- [15] HE Jiankang, MAO Mao, LI Dichen, et al. Characterization of leaf-Inspired microfluidic chips for pumpless fluid transport [J]. *Journal of Bionic Engineering*, 2014, 11: 109-114.
- [16] PAGUIRIGAN A, BEEBE D J. Gelatin based microfluidic devices for cell culture [J]. *Lab on a Chip*, 2006, 6(3): 407-413.
- [17] GREEN J V, KNIAZEVA T, ABEDI M, et al. Effect of channel geometry on cell adhesion in microfluidic devices [J]. *Lab on a Chip*, 2009, 9(5): 677-685.
- [18] SADR N, ZHU M, OSAKI T, et al. SAM-based cell transfer to photopatterned hydrogels for microengineering vascular-like structures [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(30): 7479-7490.

(编辑 杜秀杰)