

基于功能微拓扑结构的细胞定位培养芯片

撒成花^{1,2}, 薛艳³, 魏晨⁴, 梁浩彬⁵, 谢丽^{6,7}, 叶芳^{1,2}

1.西北工业大学机电学院, 陕西西安 710072; 2.空天微纳系统教育部重点实验室, 陕西西安 710072;
3.中国航空航天四川燃气轮机研究院, 四川成都 610000; 4.中航陕西航空电气有限公司, 陕西西安 713107;
5.深圳市迈瑞生物医疗电子有限公司, 广东深圳 518057; 6.西北工业大学生命学院, 陕西西安 710072;
7.空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室, 陕西西安 710072

摘要:提出了一种功能微拓扑结构细胞培养芯片,芯片结构由具有细胞粘附特异性的微平台和微柱阵列交替排布而成,并采用具有良好生物相容性和化学稳定性的聚合物制备,因此该芯片具有对细胞规约能力强和定位稳定性好的优点。芯片性能验证结果表明,所设计的功能微拓扑结构芯片细胞定位率达到90%,芯片结构及尺寸稳定性好,为需要长期细胞培养的干细胞研究提供了重要的支撑工具。

关键词:细胞定位培养芯片;功能微拓扑结构;图形化

中图分类号:Q658

文献标志码:A

文章编号:1000-2758(2020)01-0139-08

细胞图形化定位培养技术在细胞生物学、生物技术和组织工程等领域具有重要的应用价值^[1],主要包括化学修饰法和物理结构法2大类^[2-3],化学修饰法利用芯片表面修饰材料的化学性质差异(促进/抑制细胞粘附)实现细胞定位培养^[4],通过在芯片表面涂覆或填充修饰材料获得特定的“亲细胞”图形区域和“斥细胞”图形区域。然而,当化学材料修饰的芯片浸泡在细胞培养基中时,会发生修饰材料剥离、降解甚至变性,从而降低了细胞定位的效果^[5]。为了解决定位的稳定性问题,研究者提出利用物理结构来实现细胞定位培养^[6]。然而,这些微结构本身并不具备“亲细胞”和“斥细胞”功能,对细胞的规约能力低于化学修饰法,在解决稳定性的同时降低了芯片的细胞定位效果。

研究表明,细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)的机械性能,特别是刚度特性,可以介导细胞迁移、信号传导、增殖和分化^[7-8]。通过调节基底的刚度,可以改变细胞在其表面的粘附性^[3-9]。此外,细胞能够根据微柱阵列的刚度进行定向迁移^[10]。基于此,本文提出一种微平台和微柱阵列交替排布

构成的功能微拓扑结构,利用细胞在不同拓扑结构表面粘附的特异性构建“亲细胞”和“斥细胞”功能化表面,使细胞根据自身响应选择性定位生长于“亲细胞”的微平台表面,这种微拓扑结构芯片可以像化学修饰法一样严格地将细胞限制在特定位置,同时芯片采用具有良好生物相容性及高度化学稳定性的聚二甲基硅氧烷(PDMS)材料制备,可长期稳定存在于细胞培养液中,即在解决化学修饰法稳定性不足的同时保持了化学修饰法定位效果好的优势。

本文采用小鼠成骨细胞MC3T3-E1验证了芯片定位性能,重点研究了不同功能拓扑结构将细胞限制在微平台的能力,最终得到了定位效果良好的功能微拓扑结构细胞定位培养芯片。

1 材料与方法

1.1 PDMS微柱有效刚度仿真分析

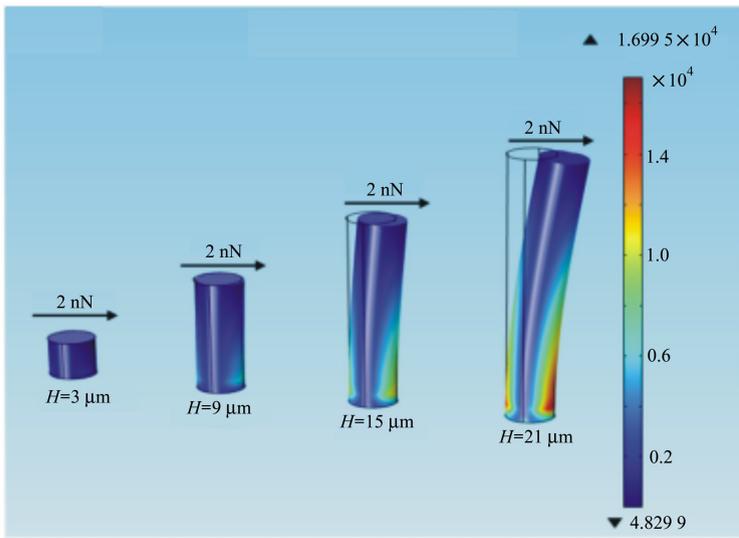
当细胞接种于微柱阵列表面时,细胞在粘附的过程中其伪足会给微柱顶端以水平牵引力,微柱在

该牵引力作用下会发生弯曲形变^[11]。为表征所设计结构的有效刚度,本文采用 COMSOL 多物理场有限元分析软件 (COMSOL V4.2, Comsol Inc., Burlington, MA) 分析了不同高度 PDMS 微柱在相同水平牵引力 F 作用下的扰度,如图 1 所示。PDMS 微柱被建模为超弹性圆柱体,其杨氏模量为 0.75 MPa,采用六面体网格单元划分,并赋予其底面固定边界条件。在所有微柱顶面节点上均匀施加水平牵引力 F ,计算微柱应力值,如图 1a) 所示。各尺寸微柱顶端中心节点的扰度绘制曲线如图 1b) 所示。根据纯

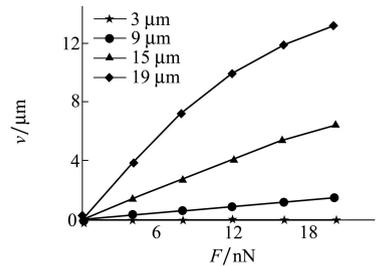
弯曲的欧拉-伯努利梁理论近似计算微柱刚度 K

$$K = \frac{3}{64} \pi E \frac{D^4}{H^3} \quad (1)$$

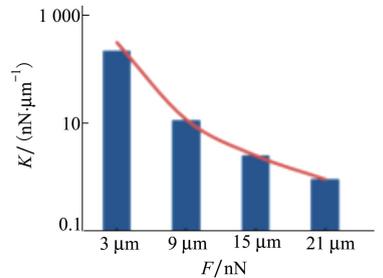
式中, E , D 和 H 分别为 PDMS 杨氏模量、微柱直径和微柱高度。由公式(1)可见,在不改变材料的整体机械性能或表面化学性质的情况下,可通过改变微柱高度 H 来调控微柱刚度 K 。在本项研究中,通过仿真分析确定微柱的刚度范围,以确保微柱阵列区域具有“斥细胞”功能。



a) 牵引力 $F=2$ nN 下各高度微柱应力图



b) 有限元分析绘制的力-扰度关系图



c) 有限元分析刚度与欧-伯努利梁理论计算结果对比图

图 1 微柱刚度有限元分析

1.1 功能微拓扑结构设计

功能微拓扑结构芯片由微平台和微柱阵列交替排布而成,如图 2 所示。为了保证细胞有足够的生长空间,微平台边长 W 设计为 $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$,微柱直径 D 设计为 $3 \mu\text{m}$ 。根据课题组前期实验研究结果,微平台和微柱阵列的高度差 ΔH 设计为 $4 \mu\text{m}$,微柱高度 H 分别为 $3, 9, 15$ 和 $21 \mu\text{m}$,并设计了 2 种不同的微柱中心间距 C 分别为 7 和 $13 \mu\text{m}$ 。

1.2 PDMS 细胞定位培养芯片制备

芯片采用具有良好生物相容性的 PDMS 材料制备。PDMS 细胞定位培养芯片的制备包含两部分:利用 MEMS 技术制备硅模板和复制模塑技术制备 PDMS 芯片。硅模板采用传统的光刻技术、铝刻蚀和电感耦合等离子体刻蚀 (inductively coupled plasma etch, ICP 刻蚀) 技术实现;再通过复制模塑

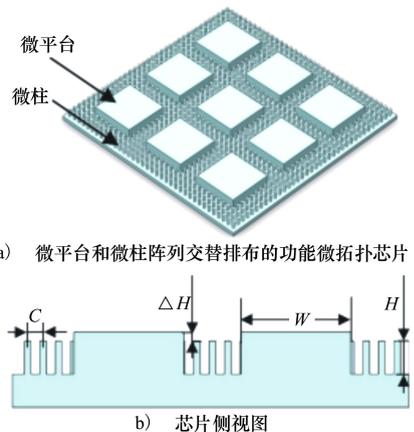


图 2 芯片结构示意图

技术将硅模板表面的微拓扑结构转移至 PDMS 材料

表面,从而得到带有微拓扑结构的 PDMS 细胞定位培养芯片。硅模板制备工艺流程如图 3 所示:首先在硅晶圆上溅射 100 nm 厚的 Al 膜作为第一个掩膜,并以 2 500 r/min 的转速在 500 μm 厚单面抛光的硅片上旋涂 EPG533 型正性光刻胶,然后使用第一层掩模版(包含微柱阵列图形)通过光刻将图形转移到光刻胶上;再通过铝刻蚀将图形转移到铝掩膜上,铝刻蚀液由磷酸(H_3PO_4):硝酸(HNO_3):冰醋酸(CH_3COOH):去离子水(H_2O)按照体积比 50:2:10:9 的比例配成,图形转移成功后用丙酮溶液去除残留的光刻胶。这时,利用第二层掩模版(包含微平台阵列图形)通过光刻胶旋涂及对准标记对准进行第二次紫外线曝光,显影后图形转移到光刻胶上;然后用铝刻蚀液刻蚀铝层;通过 ICP 刻蚀在硅片表面先刻蚀 4 μm ,再去光刻胶;最后微平台阵列区域与微柱阵列区域同时刻蚀一定深度; C_4F_8 表面钝化后,得到微平台和微柱阵列具有高度差的硅模板。

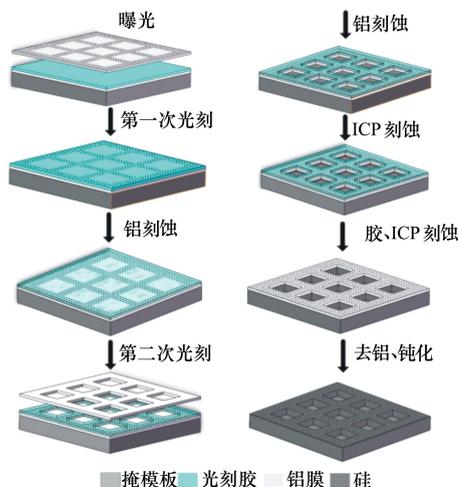


图 3 硅模板制备

由于 PDMS 聚合物材料具有良好的生物相容性、合适的机械性能和模塑成型能力,在生物研究中具有广泛的应用前景^[12]。本文涉及的 PDMS 芯片采用复制模塑技术制备,制备工艺流程如图 4 所示:首先将 PDMS(道康宁 sygard 184)预聚物与固化剂按照 10:1 比例配置,或 PDMS 弹性体溶液,在真空中脱气 15 min,浇铸在硅模板上,在 80 $^{\circ}\text{C}$ 下烘烤 1 h 固化,最后将固化好的 PDMS 从硅模板上剥离得到 PDMS 细胞定位培养芯片。再用 O_2 等离子体(Harrick 等离子体)处理 1 分钟得到亲水的 PDMS 细胞培养芯片,最后将 PDMS 细胞培养芯片小心地

切成 10 mm \times 10 mm 的小块用于后期性能验证实验。

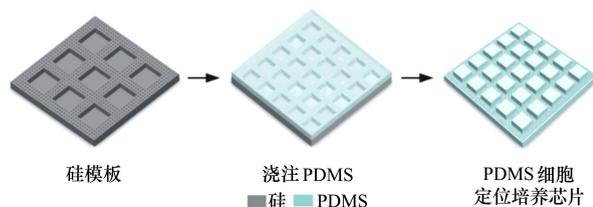


图 4 PDMS 细胞定位培养芯片制备

1.3 芯片性能验证

1.3.1 细胞培养

小鼠成骨细胞 MC3T3-E1(稳定表达 GFP)购自中国医科院基础所细胞库,细胞复苏后在含 10% 胎牛血清(Hyclone),1%L-谷氨酰胺,1%100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 青霉素(Solarbio)的 α -MEM 细胞培养液(Hyclone)中培养,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 含有 5% CO_2 的培养箱中孵育。当细胞生长到约 90% 时,使用 0.25% 的胰蛋白酶消化液将其从培养瓶底部消化分离,再离心重悬,用相同的培养基稀释至所需浓度。在细胞接种之前,使用 ^{60}Co (第四军医大学钴源室)对 PDMS 芯片进行灭菌处理,并用 0.15 mg/mL 的 I 型胶原蛋白(BD Falcon)对粘附于 12 孔培养板(Nunc)底部的 PDMS 芯片表面进行包被静置过夜,然后用无菌 PBS 冲洗 2 次,滴入约 1.5 ml 培养液,对芯片进行润湿,放置培养箱备用。最后,以每平方米 1×10^4 的浓度将 MC3T3-E1 细胞悬液悬滴到固定在 12 孔培养板中的 PDMS 芯片上,放置培养箱,根据实验需求,分别培养至 24 h 和 48 h。

1.3.2 免疫染色

在室温下,去除孔板里的细胞培养液,用 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 $1\times\text{PBS}$ (pH7.4)润洗细胞 2 次;将粘附有细胞的 PDMS 芯片在 4% 的多聚甲醛中固定 15 min,后用 PBS 清洗细胞 3 次,每次间隔 5 min;再用 0.1% Triton X-100 穿孔,提高细胞通透性,室温 5 min;用 PBS 冲洗 3 次,每次间隔 5 min;1% BSA 阻断 20 min;用 PBS 冲洗 3 次,每次间隔 10 min;添加染色剂鬼笔环肽-FITC(5 mg/ml ,Sigma),0.5 ml/孔,室温孵育 60 min(染细胞质/微丝,绿色);用 PBS 冲洗 3 次,每次间隔 5 min;再用 100 μl DAPI 溶液(100 nm,Beyotime)对细胞核进行复染约 30 s,用 PBS 清洗细胞 3 次,每次间隔 5 min,获得肌动蛋白骨架和细胞核被染成绿色和蓝色的免疫染色细胞;最后滴加适量 Fluoromount-GTM 水溶性封片剂至

PDMS 芯片上,然后用指甲油永久封片,4℃ 避光保存待用。

1.3.3 图像处理与统计学分析

采用激光扫描共聚焦显微镜 (laser scanning confocal microscopy, LSCM, Leica sp) 获取染色的 MC3T3-E1 细胞荧光图像,然后利用 Image J 软件 (National Institutes of Health, USA) 对图像进行处理分析。所得荧光图像数据利用 IBM SPSS 统计学分析软件分析处理,采用 Student's-t 检验和方差分析, $P < 0.05$ 表示有显著性差异, $P < 0.01$ 表示有极显著性差异。数据结果为 3 次实验结果的平均值,每次实验 3 个样本。

2 结果与讨论

2.1 PDMS 微柱刚度的表征

图 1a) 显示,微柱高度决定了微柱在受 2 nN 水平牵引力 F 作用下的弯曲程度。本文通过有限元分析仿真得到微柱受牵引力作用下的挠度大小,结合公式(1)计算得到微柱刚度 K ,如表 1 所示。通过调节 PDMS 微柱的高度 H (范围从 3~21 μm),对应

的微柱刚度范围为 0.99~246.91 $\text{nN}/\mu\text{m}$ 。根据计算结果及 Truong 等人对附着在微柱上的细胞中肌动蛋白聚合影响的研究^[13],我们认为高度大于 9 μm 的微柱没有足够的应力来支撑 MC3T3-E1 细胞纤维的张力,因而可以抑制细胞粘附。

表 1 不同高度的微柱与对应刚度值

微柱高度 $H/\mu\text{m}$	微柱抗度 $v/\mu\text{m}$	微柱刚度 $K/(\text{nN} \cdot \mu\text{m}^{-1})$
3	0.008 1	246.91
9	0.199 1	10.05
15	0.891 1	2.24
21	2.017 8	0.99

2.2 PDMS 芯片及其硅模板测量与分析

本文所设计的 PDMS 细胞定位培养芯片的制备主要包括硅模板制备和 PDMS 芯片制备 2 个工艺过程。现对比设计结构、硅模板结构和 PDMS 芯片,分析后微结构 2 个工艺参数变化。图 5 和 6 分别为所制备的部分硅模板和 PDMS 芯片的扫描电子显微镜图像。可观察到不论是硅模板还是复形所得 PDMS 芯片,其表面微结构完整性良好,无缺损,且拓扑结构形状、大小一致性高。

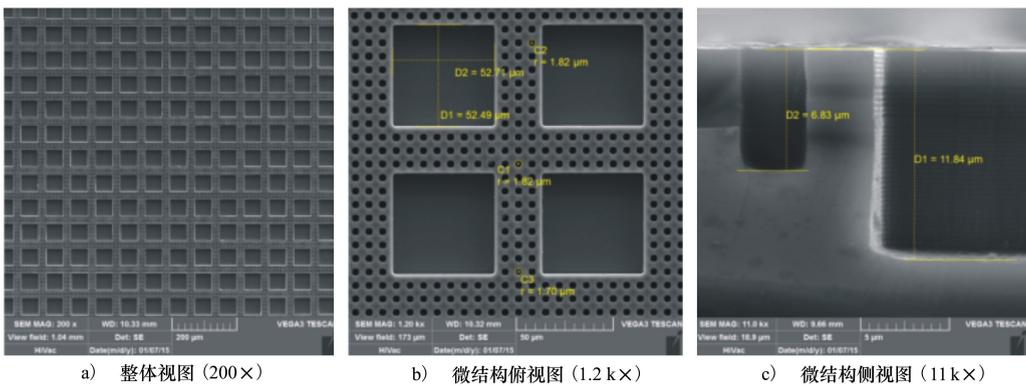


图 5 硅模板微结构扫描电镜图

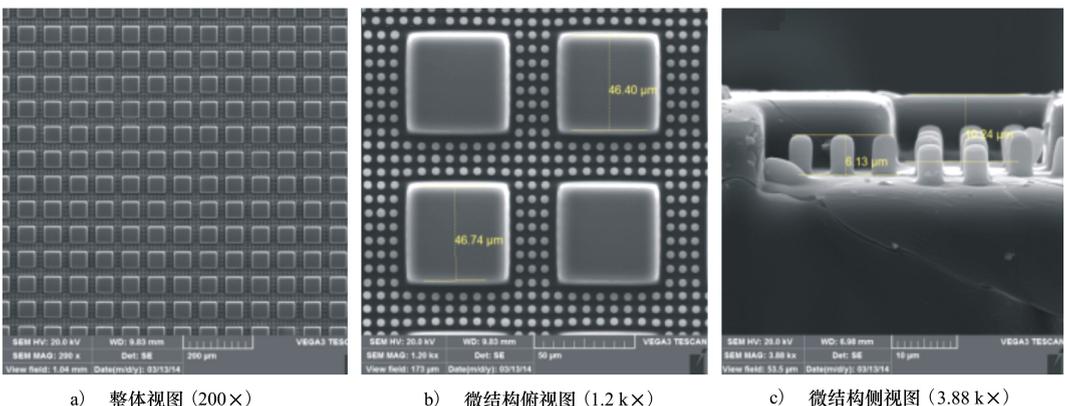


图 6 PDMS 微结构扫描电镜图

2.3 PDMS 芯片定位性能验证结果

2.3.1 细胞形态学分析

有研究报道,表面形貌和结构机械性能可通过调节肌动蛋白细胞骨架来控制多种细胞过程^[14]。本文中,通过 MC3T3-E1 细胞在不同微柱高度的芯片上的粘附形态,判断细胞是否呈现正常的生命形态以及所设计芯片结构对细胞的规约能力。通过图

7 的荧光图像合成图可以看到,当细胞随机接种在不同高度的芯片上培养 48 h 后,生长在微平台上的 MC3T3-E1 细胞形态与微柱阵列区域上生长的细胞形态存在明显差异:生长在微柱阵列区域的细胞收缩成纺锤形,如图 7a) 所示;而生长在微平台区域的细胞其骨架沿微平台边缘铺展充分,如图 7d) 所示,表明细胞具备良好的生长形态和活力。

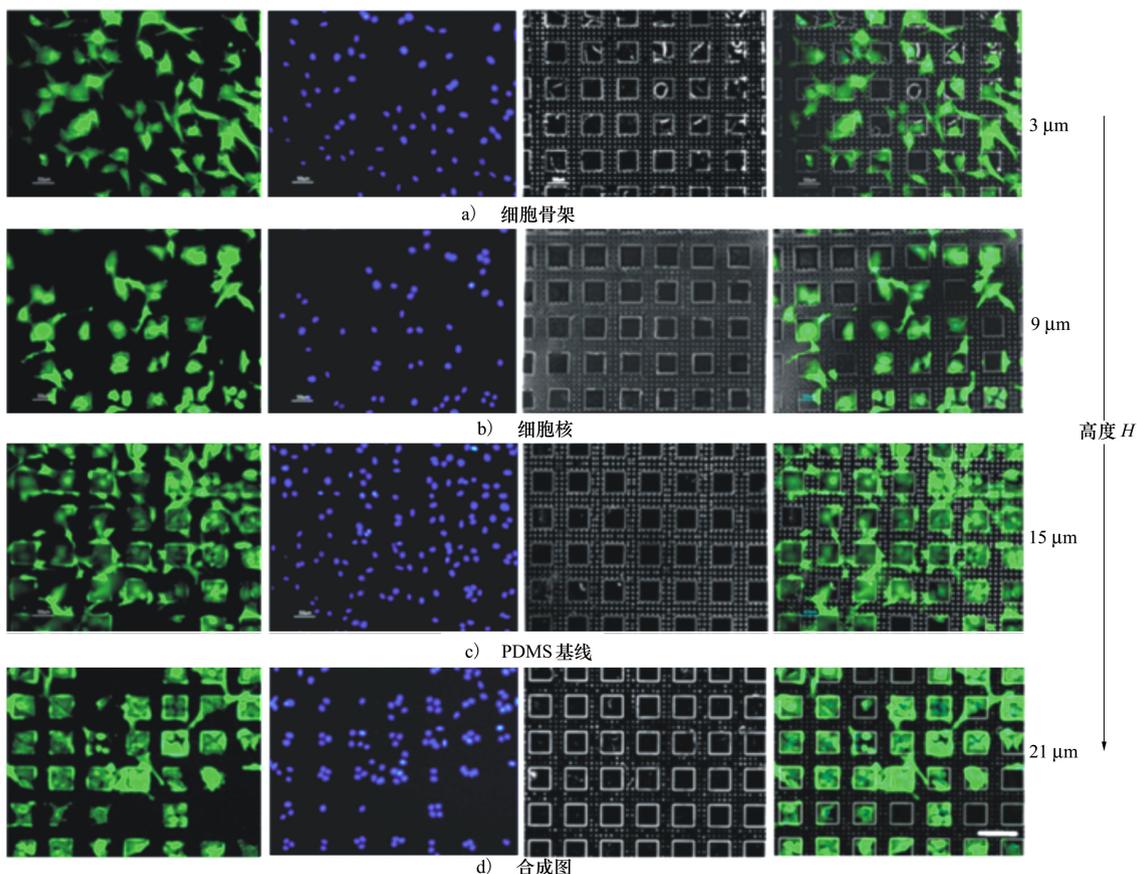


图 7 MC3T3-E1 细胞在不同尺寸芯片上生长的免疫荧光图

此外,在微柱高度 $3\ \mu\text{m}$ 的芯片上,细胞随机粘附在整个芯片表面,微柱阵列没有呈现出显著的抑制细胞生长的特性(如图 7a) 所示),随着微柱高度的增加,细胞粘附位点相应发生变化,逐渐从芯片的微柱阵列区域转向微平台区域,因此,生长在微柱阵列表面的细胞数量逐渐减少,而生长在平台表面的细胞数量逐渐增多(如图 7a) 至 7d) 所示)。特别地,当微柱高度达到 $21\ \mu\text{m}$ 时,芯片基底结构的调控使得 MC3T3-E1 细胞的空间分布更加规律,微柱阵列区域极少有细胞粘附,而在微平台表面即使多个细胞粘附于同一平台上,各个细胞骨架铺满整个微平台表面也不会铺展到微平台之外的微柱阵列区

域(如图 7d) 所示),表明此时微柱阵列对于 MC3T3-E1 细胞粘附具有显著的抑制作用。由表 1 可知,当微柱高度 H 从 3 增加到 $21\ \mu\text{m}$ 时,刚度 K 从 246.91 下降到 $0.99\ \text{nN}/\mu\text{m}$,而 MC3T3-E1 细胞作为生长在骨表面的成骨细胞更倾向于生长在较硬的芯片表面,因此,从细胞形态学角度我们可以看到,当微柱高度 $H=21\ \mu\text{m}$ (刚度为 $0.99\ \text{nN}/\mu\text{m}$) 时不能满足 MC3T3-E1 细胞生长所需刚度,从而起到抑制 MC3T3-E1 细胞粘附的作用。

2.3.2 细胞定位定量分析

为了更好地评价不同结构参数芯片的细胞定位效果,我们引入了细胞定位率的概念。所谓细胞定

位率,是指使用倒置显微镜或荧光显微镜观察结果芯片时,在所观察视野范围内,生长在微平台阵列区域的细胞数量与视野范围内细胞总数的百分比,见下式:

$$\text{细胞定位率} = \frac{\text{微平台阵列区域的细胞数量}}{\text{观察范围内的细胞总数}} \times 100\% \quad (2)$$

本文研究了 MC3T3-E1 细胞在不同微柱高度的 PDMS 芯片上孵育 48 h 的粘附情形,如图 8 所示。

图 9a) 至 9b) 定量比较了芯片不同微柱高度对细胞的规约能力,我们发现芯片上的细胞粘附位点受到微柱高度的有效调控。微平台的细胞定位率随着微柱高度的增加而增加,21 μm 高的微柱可显著抑制细胞粘附。研究发现,微柱中心距离对调节细胞粘附位点的作用不显著,但在微柱高度为 21 μm 的芯片上,微柱中心间距为 13 μm 的微柱阵列较 7 μm 的微柱阵列对细胞的抑制作用更强。

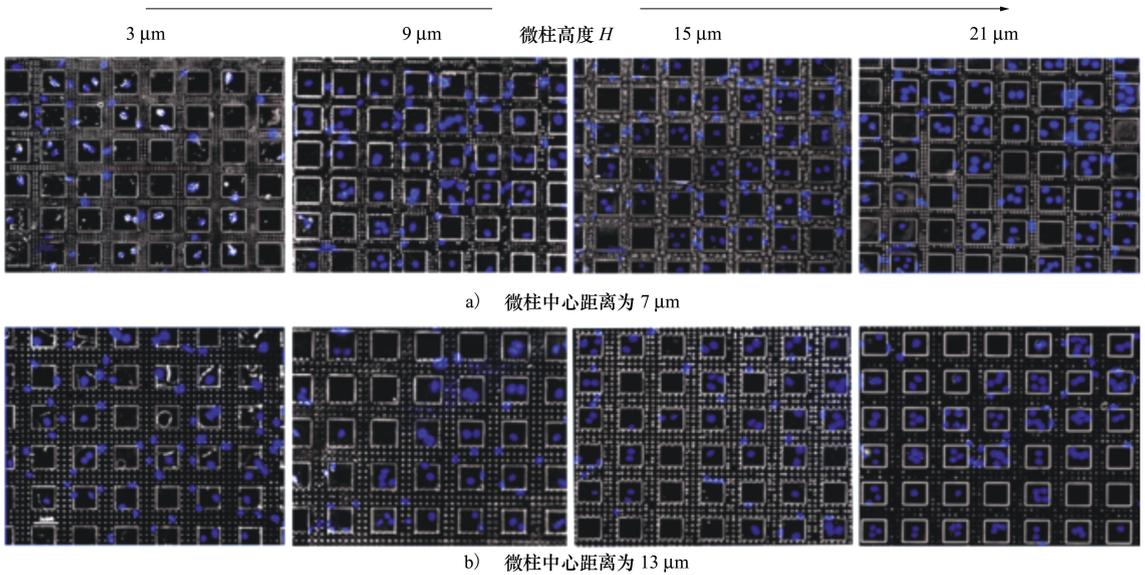


图 8 48 h 后,MC3T3-E1 细胞粘附情况

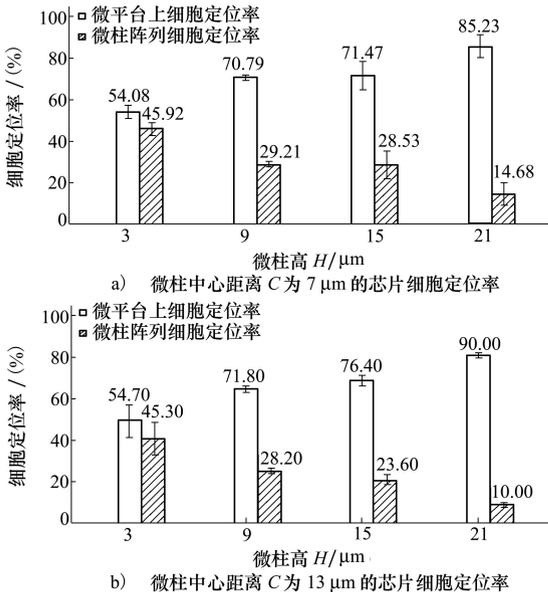


图 9 不同尺寸芯片细胞定位率定量分析结果

MC3T3-E1 细胞粘附的显著差异表明微平台提供了较好的表面粘附特性,而微柱则随着高度的增加和刚度的降低而抑制细胞粘附。由上述分析可知,实现 MC3T3-E1 细胞定位生长的最佳 PDMS 芯片结构为微柱直径 $D=3 \mu\text{m}$ 、微柱高 $H=21 \mu\text{m}$ 、微柱中心距 $C=13 \mu\text{m}$ 。该芯片结构可以将细胞高度规约在微平台区域,细胞定位率为 90%,可以满足长期细胞定位培养的需求。

3 结 论

细胞在芯片上的定位生长受到芯片表面细胞粘附特异性的调控。本论文研究提出利用功能拓扑结构构建具有细胞粘附特异性的“亲细胞”和“斥细胞”功能性表面,通过改变微柱阵列刚度达到抑制细胞粘附生长的目的,从而实现细胞定位培养。微柱高度的变化导致细胞粘附位点的切换,对于

MC3T3-E1 细胞而言,随着高度的增加,细胞的粘附位点从微柱阵列区域迁移到微平台区域,从而将细胞规约在平台表面,实现细胞的定位培养。在细胞培养基中,微拓扑结构保持完整,满足稳定培养的条件。当微柱直径为 3 μm 、高度为 21 μm 、中心距离为 13 μm 、微平台边长为 50 μm 、高 25 μm 时,细胞铺展状态良好,细胞体沿着微平台表面排列更规律,定位效果良好。即使多个细胞定位于同一微平台上,也不会扩散到微平台之外的微柱阵列区域,表明所设计的微柱阵列结构对 MC3T3-E1 细胞具有很强的

规约能力。本文所设计制备的 PDMS 芯片具备化学修饰法对细胞规约能力强、定位效果好的优点,而芯片结构和材料的稳定性使其兼备物理结构法稳定性好的优点,同时芯片制备简单,可复现性高,有望为细胞-细胞、细胞-材料间相互作用、干细胞分化、基于细胞的生物传感器及单细胞研究等领域提供有效的分析工具。该芯片定位原理具有普遍适用性,研究者可根据不同细胞的粘附特性设计芯片结构尺寸,实现细胞的定位培养。

参考文献:

- [1] ZHOU X, LI J, SUN H, et al. Controlled Cell Patterning on Bioactive Surfaces with Special Wettability[J]. *Journal of Bionic Engineering*, 2017, 14(3): 440-447
- [2] GUVEN S, CHEN P, INCI F, et al. Multiscale Assembly for Tissue Engineering and Regenerative Medicine[J]. *Trends in Biotechnology*, 2015, 33(5): 269-279
- [3] FU Jianping, WANG Yangkao, CHEN Christopher, et al. Mechanical Regulation of Cell Function with Geometrically Modulated Elastomeric Substrates[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(9): 733-736
- [4] CHOI J S, KIM D H, SEO T S. Facile Endothelial Cell Micropatterning Induced by Reactive Oxygen Species on Polydimethylsiloxane Substrates[J]. *Biomaterials*, 2016, 84: 315-322
- [5] JEON H J, SIMON C G, KIM G H. A Mini-Review: Cell Response to Microscale, Nanoscale, and Hierarchical Patterning of Surface Structure[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2014, 102(7): 1580-1594
- [6] YIANNAKOU C, SIMITZI C, MANOUSAKI A, et al. Cell Patterning via Laser Micro/Nano Structured Silicon Surfaces[J]. *Biofabrication*, 2017, 9(2): 1-8
- [7] HAN Fengxuan, ZHU Caihong, GUO Qianping, et al. Cellular Modulation by the Elasticity of Biomaterials[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2016(4): 9-26
- [8] Doyle, Andrew D, Yamada, Kenneth M. Mechanosensing via Cell-Matrix Adhesions in 3D Microenvironments[J]. *Experimental Cell Research*, 2016, 343(1): 60-66
- [9] MAURIZIO V, PAOLO N. Controlling Cell Functions and Fate with Surfaces and Hydrogels: the Role of Material Features in Cell Adhesion and Signal Transduction[J]. *Gels*, 2016, 2(1): 12
- [10] SONG J, SHAWKY J H, KIM Y T, et al. Controlled Surface Topography Regulates Collective 3D Migration by Epithelial-Mesenchymal Composite Embryonic Tissues[J]. *Biomaterials*, 2015, 58: 1-9
- [11] HUI J, PANG S W. Dynamic Tracking of Osteoblastic Cell Traction Force during Guided Migration[J]. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 2017, 11(1): 11-23
- [12] GUTEKUNST S B, CARSTEN G, ALEXANDER K, et al. Influence of the PDMS Substrate Stiffness on the Adhesion of, *Acanthamoeba Castellani*[J]. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2014, 5: 1393-1398
- [13] TRUONG D T, BAHLS C, NEBE B, et al. An Implementation for the Simulation of Cells on Micro-Post Arrays[C]//2016 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2016: 6138-6141
- [14] OKEYO K O, MIYOSHI H, ADACHI T. Design Concept of Topographical and Mechanical Properties of Synthetic Extracellular Matrix to Control Cell Functions and Fates Through Actin Cytoskeletal Modulation[M]. Tokyo: Springer Japan, 2015: 159-189

Cell Positioning Culture Chip Based on Functional Micro Topological Substrate

SA Chenghua^{1,2}, XUE Yan³, WEI Chen⁴, LIANG Haobin⁵, XIE Li^{6,7}, YE Fang^{1,2}

- 1.School of Mechanical Engineering, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China;
- 2.Key Laboratory of Micro/Nano Systems for Aerospace, Ministry of Education, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China;
- 3.China Hangfa Sichuan Gas Turbine Research Institute, Chengdu 610000, China;
- 4.AVIC Shaanxi Aero Electric Co Ltd, Xi'an 713107, China;
- 5.Shenzhen Mindray Bio-medical Electronics Co Ltd, Shenzhen 518057, China;
- 6.School of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China;
- 7.Key Laboratory of Space Bioscience and Biotechnology, Institute of Special Environmental Biophysics, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China

Abstract: There are two main categories of cell positioning culture chips: chemical modification of surfaces and physical structure methods. The chemical methods have the advantage of providing a strong binding force, but the instability of chemical materials limits its application. The physical methods have the advantage of good stability for cell positioning, while the nonspecificity of physical structure weakens the ability to regulate cells. Here, we propose a functional micro topological chip. The chip is composed of micro-platform and micro-post array with different adhesion characteristics. At the same time, the chip is prepared by a polymer material with good biocompatibility and high chemical stability; therefore, it has the advantages of strong cell constraint ability and good localization stability. The result of chip performance verification shows that the cell localization rate of the functional micro topological chip is up to 90%, and the chip structure and dimension stability are good. The study provides an important supporting tool for the research of stem cells and their differentiation that need long-term cell culture.

Keywords: cell positioning culture chip; functional micro topology; micro pattern