

文章编号 1004-924X(2017)09-2277-06

水凝胶支架的飞秒激光全息加工

潘 登,李家文*,杨 亮,胡衍雷,吴 东,黄文浩,褚家如
(中国科学技术大学 精密机械与精密仪器系,安徽 合肥 230026)

摘要:为了实现以水凝胶为材料的细胞支架快速加工,将计算全息法引入传统的飞秒激光双光子加工中,并对全息图的生成方法和全息图对加工结构的影响进行了研究。首先,根据贝塞尔光波动方程和其透射函数生成贝塞尔光束全息图,分析两种参数对环形结构大小和质量的影响。然后利用生成的全息图加工得到壁厚 800 nm、直径为 8~15 μm 不等的水凝胶(PEGDA)圆管结构。最后,实现了基于圆管道的水凝胶细胞支架高效快速加工,支架中圆管道壁厚 800 nm、直径为 8 μm 。本文首次将飞秒激光全息加工技术应用于水凝胶三维支架加工,解决了飞秒激光单点加工效率的问题。该技术在生物医学中具有广阔的应用前景。

关键词:飞秒激光;双光子加工;贝塞尔光束;水凝胶;细胞支架

中图分类号:TN249;TH691.9 **文献标识码:**A **doi:**10.3788/OPE.20172509.2277

Femtosecond laser holographic fabrication of hydrogel cell scaffold

PAN Deng, LI Jia-wen*, YANG Liang, HU Yan-lei, WU Dong, HUANG Wen-hao, CHU Jia-ru

(*Department of Precision Machinery and Precision Instrumentation,
University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China*)

* *Corresponding author, E-mail: jwl@ustc.edu.cn*

Abstract: In order to achieve rapid fabrication of hydrogel cell scaffolds, the computer-aided holographic method was employed into the traditional femtosecond laser two-photon processing. The generation of hologram as well as the influence of its parameters on the processed cylinder microstructure was studied. Firstly, Ring-shaped Bessel-beam holograms were generated according to the Bessel light wave equation and its transmission function, of which the parameters' effect on the size and quality of ring structure was analyzed. Then the generated holograms were used to process tubes with a thickness of 0.8 μm and diameters from 8 μm to 15 μm in the polyethylene glycol double acrylate (PEGDA) hydrogel. Finally, an efficient and rapid processing of hydrogel cell scaffolds was realized experimentally and the diameter of hydrogel tubes was 8 μm . This technique can remarkably improve the efficiency of femtosecond laser processing, thus has great potential in many applications such as biological culture and chemical analyses.

Key words: femtosecond laser; two-photon processing; Bessel beam; hydrogel; cell scaffold

收稿日期:2017-06-05;修订日期:2017-06-27.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 51675503, No. 61475149, No. 51405464, No. 61675190, No. 51605463);
中央高校基础研究经费资助项目(No. WK2480000002);中国博士后科学基金资助项目(No. 2016M590578, No. 2016M602027);中科院仪器研制项目(No. YZ201566)

1 引言

水凝胶是一种高含水量的三维网状聚合物,是最有潜力替代生体软组织的生物材料,已广泛应用于组织工程等领域^[1]。三维细胞支架结构决定培育细胞后组织的形貌特点和细胞的生长情况,因此通过构建可控的三维细胞支架来灵敏地控制细胞的增殖行为^[2]和迁移行为^[3],在组织工程研究领域具有十分重要的意义。

目前,水凝胶细胞支架的加工方法有很多种^[4-5]。Xu 等利用喷嘴技术打印出水凝胶支架,然而受制于喷嘴孔的大小,其打印的结构特征尺寸一般大于 $50\ \mu\text{m}$ ^[6]。Soman 等利用数字光处理(DLP)面投影式光刻能够快速加工出水凝胶支架结构,但加工出的结构特征尺寸较大且很难打印出任意的三维结构。飞秒激光双光子加工技术具有真三维、高分辨和加工材料广泛等优点^[7]。Zhang 等^[8]利用飞秒激光打印出线型结构为 $400\ \text{nm}$ 的木堆型水凝胶(PEGDA)细胞支架,由于采用单焦点扫描方式,利用飞秒激光进行细胞支架加工的效率很低。近年来,本课题组发展了飞秒激光全息技术,利用液晶空间光调制器(Spatial Liquid Modulation, SLM)将飞秒激光光场调制成焦点阵列、线、圆环、面、体结构^[9-12],并将它们作为基本加工单元,在保证高加工分辨率的同时($800\ \text{nm}$),极大地提高了飞秒激光双光子的加工效率。本文首次应用飞秒激光全息加工技术加工水凝胶三维支架,解决了飞秒激光单点加工效率低的问题,为飞秒激光加工技术在生物医学中的应用提供一种新的思路。

2 飞秒激光全息加工系统和贝塞尔光束生成方法

2.1 飞秒激光全息加工系统

实验加工系统如图 1 所示。飞秒激光波长 $\lambda=800\ \text{nm}$,重复频率 $f=80\ \text{MHz}$,脉冲宽度为 $75\ \text{fs}$ 。激光能量通过半波片和格兰泰勒棱镜控制,激光在经过扩束镜扩束后照射到 SLM 上。SLM 加载预先设计好的全息图,将高斯光束调制成贝塞尔光束。由于 SLM 为衍射元件,因此光束调制后会产生多个级次,本系统利用光阑仅使

+1 级次衍射光通过。调制光束最后进入油镜(Olympus, $60\times$, $\text{NA}=1.35$),经过油镜聚焦将目标光场照射到样品上。样品放置在三维压电工作台(PI Inc., E545)上并且通过计算机控制压电工作台的位置,样品的加工过程可通过 CCD 实时观察。

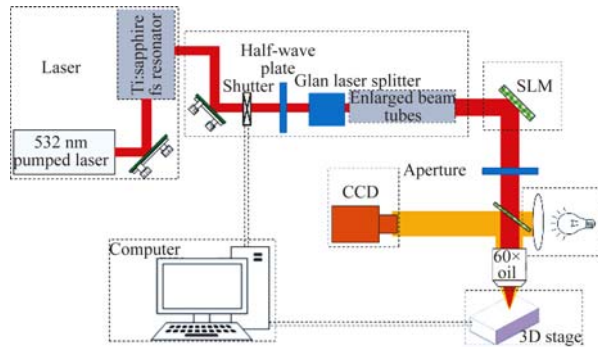


图 1 飞秒激光全息加工系统示意图

Fig. 1 Schematic illustration of femtosecond laser holographic fabrication system

2.2 基于数字全息的贝塞尔光束产生方法

SLM 是一种对光束相位进行调制的衍射光学元件,可以通过改变液晶分子排列调制入射光的相位。利用这种性质可以在 SLM 上加载多种光场相位函数,实现对光场的控制。

贝塞尔光束是 J. Durnin 等人提出的空间标量波动方程的一组特殊解,这个解可以用第一类零阶贝塞尔光来描述,因此贝塞尔光束是一种无衍射光。贝塞尔光的表达式如下:

$$E(r, \varphi, z) = A_0 \exp(ik_z z) J_n(k_r r), \quad (1)$$

其中: A_0 表示振幅, φ 和 r 表示观察屏的极坐标, z 表示在光束传播方向上观察屏与初始平面的距离, J_n 表示阶数为 n 的第一类贝塞尔函数。理想的贝塞尔光在垂直于传播方向的平面观察屏上的光强分布为一系列的同轴圆环,由于贝塞尔光的无衍射特性,因此在传播方向光强并不发生变化。

本实验所使用的贝塞尔光束是用计算全息法生成的,其透射函数为:

$$T_n(r, \theta) = \exp(in\theta) \exp(-i2\pi r/r_0), \quad (2)$$

其中: r 和 θ 是全息平面中的极坐标, r_0 是一个可控的参数。式(2)所对应的相位表达式为:

$$\varphi_h = n\theta - 2\pi r/r_0. \quad (3)$$

式(2)有两个分量可以考虑,第一个分量是

$in\theta$,表示相位奇异度,其中 n 表示 n 阶贝塞尔光束;第二个分量产生了一个零级贝塞尔光束。为了能在 SLM 上实现式(3),将式(2)中的极坐标 r 改写

$$E(\rho, \varphi, z) = \left[\exp\left(\frac{ik\rho^2}{2z}\right) \exp(ikz)/ikz \right] \exp[in(\varphi - \pi/2)] \times \int_0^R \exp\left(\frac{ik\rho^2}{2z}\right) \exp(i2\pi r/r_0) J_n(kr\rho/z) r dr,$$

其中: J_n 为第一类 n 阶贝塞尔函数, ρ 和 φ 为观察平面内的极坐标。

图 2 可以简要说明式(1)~式(4)的原理,一束激光先入射到螺旋相位板上然后经过锥形镜调制,得到的衍射光束即为贝塞尔光束,然后贝塞尔光经过物镜头聚焦可以得到环形光场。

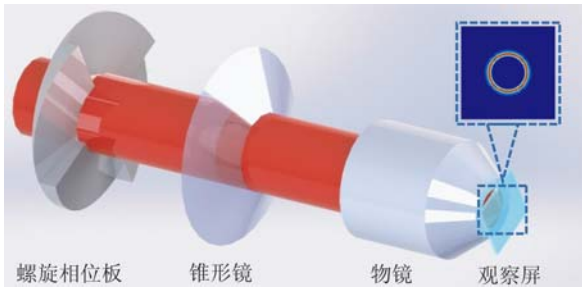


图 2 贝塞尔光生成示意图

Fig. 2 Schematic diagram of Bessel-beam generation

由于空间光调制器存在死区,圆环中心会产生很强的零级光,为了避免零级光对所调制光场的影响,这里用叠加闪耀光栅的方法对所调制的贝塞尔光束进行偏移,如图 3 所示。

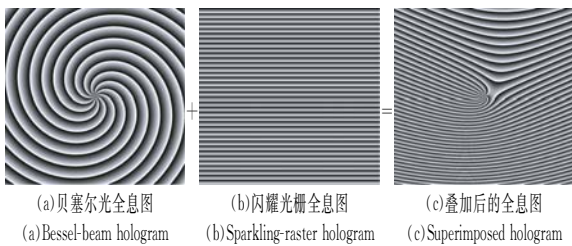


图 3 用于系统加工的贝塞尔与闪耀光栅的全息图叠加
Fig. 3 Superimposed computer generated holograms of Bessel-beam and blazed grating used for fabrication

2.3 不同直径贝塞尔光束的调控方法

根据式(2)可知,贝塞尔光中能调节的参数有阶数 n 和可控半径 r_0 两个。为了选取最优参数实现环形光场的直径调制,利用 MATLAB 程序对不同参数进行菲涅耳衍射仿真分析。图 4 的仿真结果表明,当阶数 n 不变,可控参数 r_0 增大时,

为 $r^2 = (i^2 + j^2) \Delta^2$,其中 i, j 为整数,表示 SLM 上像素点的位置, Δ 表示像素周期。在空间光调制器后面距离为 z 的平面内电场分布描述为:

$$(4)$$

贝塞尔光场的截面直径减小。图 5 的仿真结果表明,当可控 r_0 不变时,随着阶数 n 的增大,贝塞尔光场的截面直径增大。虽然调控参数 n 和参数 r_0 都能改变衍射面上贝塞尔光场直径的大小,但是根据仿真结果,如果通过改变阶数 n 来调控圆环直径的大小,随着贝塞尔光阶数的增大,衍射产生的同心圆环会增多,将会导致光束能量分散,不利于高精度加工。由图 6 可知, $n=40$ 时的光场能量分布明显要比 $n=15$ 时的分散; $n=15$ 时圆环质量好、能量集中度高。因此,本文通过调控参数 r_0 来改变光束直径。

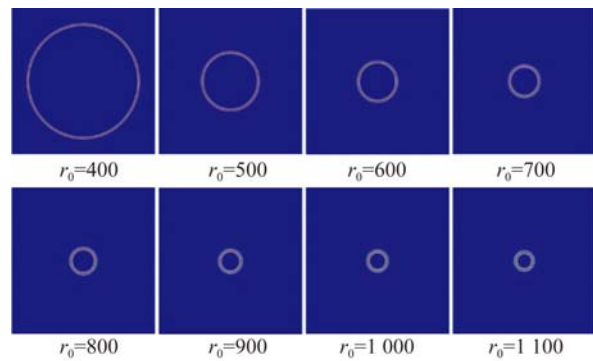


图 4 当 $n=15$,不同 r_0 的聚焦光场能量分布
Fig. 4 Transversal intensity distributions of Bessel beams with different r_0 for $n=15$

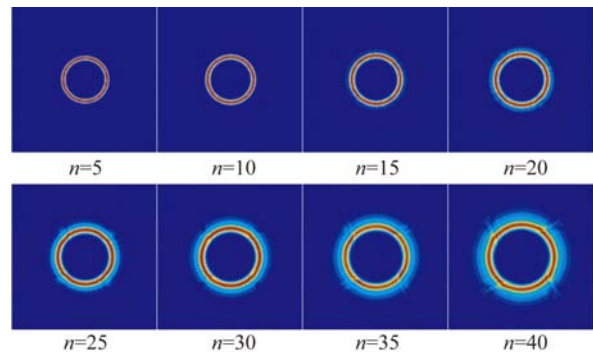
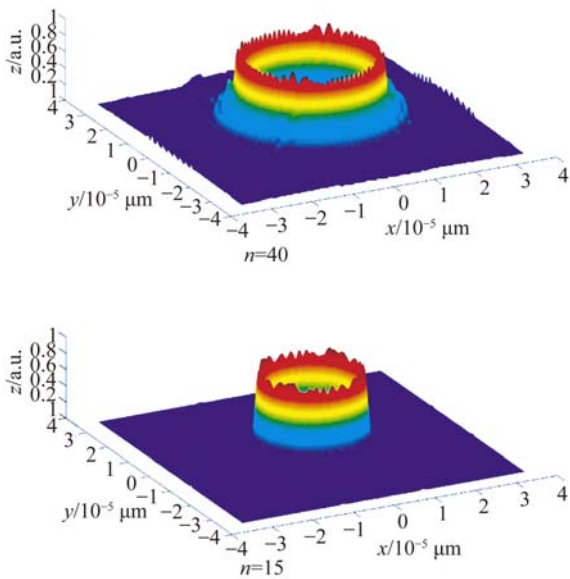


图 5 当 $r_0=600$,不同 n 的聚焦光场能量分布
Fig. 5 Transversal intensity distributions of Bessel beams with different n for $r_0=600$

图 6 $n=15$ 和 $n=40$ 时的光场对比Fig. 6 Comparison of light intensity distribution with $n=15$ and $n=40$

3 实验

3.1 水凝胶圆管的加工

实验用水凝胶为聚乙二醇双丙烯酸酯 (PEGDA, 分子量 700), 光引发剂为 Irgacure2959 (IRG2959), 将水凝胶与光引发剂按照质量比 100 : 5 充分混合, 用 80 °C 水浴保温 15 min, 然后在超声波振荡仪中振荡 5 min, 最后将超声混合的样品放入真空泵中抽真空, 去除样品中的空气。

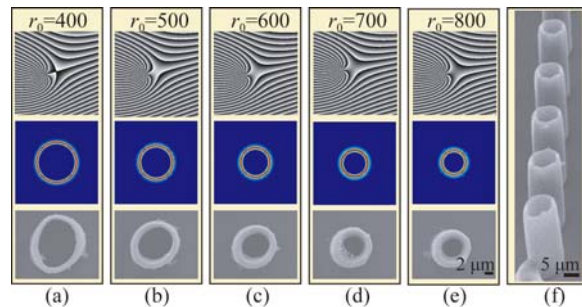
首先将制备好的水凝胶光引发剂混合物旋涂在玻片上, 旋涂厚度为 200~300 μm 。然后, 将玻片放置在显微镜物镜头下进行加工。加工完成后, 样品放在分析醇酒精中静置 15 min 去除未聚合的水凝胶。最后, 加工好的样品经过临界干燥、蒸金后, 被放置在扫描电子显微镜 (SEM) 中拍照观察。图 7 为采用 $n=20$, 半径为 400~800 等一系列全息图进行加工的实验结果。图 7(a)~7(e) 分别为 $r_0 = 400, 500, 600, 700, 800$ 的全息图、仿真图及其加工出的管道, 图 7(f) 图为加工管道的 3 维形貌, 从上到下依次对应 $r_0 = 400, 500, 600, 700, 800$ 。同时对加工的管道直径进行统计, 统计结果如表 1 所示。

表 1 可控尺寸与圆形管道直径对应关系

Tab. 1 Control size r_0 corresponds to diameter of cylinder tubes

可控尺寸 r_0	加工圆形管道直径/ μm
400	14.50
500	10.83
600	10.04
700	9.02
800	8.55

从加工结果可以看出, 与之前的分析结果一样, 在能量不变的情况下随着可控尺寸 r_0 的增大, 加工出的圆环直径逐渐减小。因此, 通过调控 r_0 可以很好地控制加工管道的直径。

图 7 使用不同全息图加工得到的圆管图: (a)~(e) 分别为 $r_0 = 400 \sim 800$ 的全息图、仿真光场及加工结果电镜图, (f) 管道阵列电镜图, 从下至上依次对应 $r_0 = 400 \sim 800$ Fig. 7 Cylinder microstructures fabricated with different holograms. (a) ~ (e) simulation and processing results for $r_0 = 400 \sim 800$ respectively; (f) Tilted 3D view of tubes

3.2 基于圆管的水凝胶细胞支架加工

水凝胶在生物医疗等方面有着广泛的应用, 常常被用来加工细胞支架。传统的细胞支架加工方法受限于加工尺寸、加工效率和加工精度等因素, 而使用计算全息生成贝塞尔光的方法可以方便快速地加工出这种细胞支架。

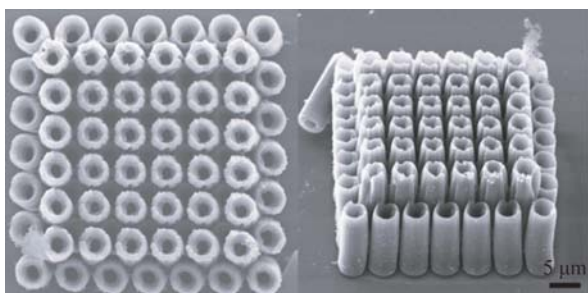


图8 飞秒激光计算全息加工的细胞支架

Fig. 8 Hydrogel cell scaffold fabricated by femtosecond laser based on CGH

图8为利用贝塞尔光束加工的双层细胞支架,加载全息图参数为 $n=15$, $r_0=800$,扫描速度为 $20 \mu\text{m/s}$ 。加工的单个管道壁厚 $0.8 \mu\text{m}$,直径为 $8 \mu\text{m}$,高度为 $30 \mu\text{m}$ 。第一层为 7×7 的管道阵列,第二层为 6×6 的加工阵列。如果使用传统的逐层扫描,加工这种支架需要几个小时,但是使用计算全息法,单个管道只需要 3 s 即可完成加工,整个阵列的加工仅需 5 min 。与传统的单点扫描水凝胶加工方法相比,在高速扫描的情况下 ($150 \mu\text{m/s}$),单点扫描的分辨率在 900 nm 左

参考文献:

- [1] SLAUGHTER B V, KHURSHID S S, FISHER O Z, *et al.*. Hydrogels in regenerative medicine [J]. *Advanced Materials*, 2009, 21(32-33):3307-3329.
- [2] CHAN V, COLLENS M B, JEONG J H, *et al.*. Directed cell growth and alignment on protein-patterned 3D hydrogels with stereolithography [J]. *Virtual and Physical Prototyping*, 2012, 7(3): 219-228.
- [3] AUBIN H, NICHOL J W, HUTSON C B, *et al.*. Directed 3D cell alignment and elongation in micro-engineered hydrogels [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(27):6941-6951.
- [4] ZHU W, MA X Y, GUO M L, *et al.*. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 40:103-112.
- [5] LEE J W. 3D nanoprinting technologies for tissue engineering applications [J]. *Journal of Nanomaterials*, 2015, 2015:213521.
- [6] XU T, ZHAO W X, ZHU J M, *et al.*. Complex heterogeneous tissue constructs containing multiple

cell types prepared by inkjet printing technology [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(1):130-139.

[7] 王国彪. 光制造科学与技术的现状和展望[J]. *机械工程学报*, 2011, 47(21):157-169.

WANG G B. Photonic manufacturing science & technology:overview and outlook [J]. *Journal of Mechanical Engineering*, 2011, 47(21):157-169. (in Chinese)

[8] ZHANG W D, CHEN S C. Femtosecond laser nanofabrication of hydrogel biomaterial [J]. *MRS Bulletin*, 2011, 36(12):1028-1033.

[9] YANG L, EL-TAMER A, HINZE U, *et al.*. Two-photon polymerization of cylinder microstructures by femtosecond Bessel beams [J]. *Applied Physics Letters*, 2014, 105(4):041110.

[10] ZHANG C C, HU Y L, LI J W, *et al.*. A rapid two-photon fabrication of tube array using an annular Fresnel lens [J]. *Optics Express*, 2014, 22(4):3983-3990.

[11] ZHANG C C, HU Y L, LI J W, *et al.*. An improved multi-exposure approach for high quality holographic femtosecond laser patterning [J]. *Applied Physics Letters*, 2014, 105(22):221104.

4 结 论

本文利用飞秒激光全息加工出基于圆管的水凝胶支架。首先,利用计算全息法生成贝塞尔光的全息图,对贝塞尔光束的调控参数进行仿真分析,根据仿真分析结果加工出直径为 $8 \sim 15 \mu\text{m}$ 的水凝胶管道,最后加工出基于圆管的水凝胶支架结构。相对于传统的飞秒激光单点扫描方法,飞秒激光全息加工只需要经过单次曝光就可以拉伸出表面质量良好的圆形管道,单根管道的加工时间仅为 3 s ,在保证加工分辨率的同时,将加工效率提升了 $2 \sim 3$ 个数量级,在大面积细胞支架的加工中具有广阔的应用前景。

- [12] YANG L, EL-TAMER A, HINZE U, *et al.*. Parallel direct laser writing of micro-optical and photonic structures using spatial light modulator [J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2015, 70:26-32.
- [13] BRIGO L, URCIUOLO A, GIULITTI S, *et al.*. 3D high-resolution two-photon crosslinked hydrogel structures for biological studies [J]. *Acta Biomaterialia*, 2017, 55:373-384.

作者简介:

潘 登(1996—),男,安徽六安人,2012年于北京科技大学获得学士学位,主要从事飞秒激光加工和光场调控方面的研究。E-mail: dpan@mail.ustc.edu.cn

通讯作者:

李家文(1971—),男,安徽舒城人,博士,副教授,2011年于中国科学技术大学获得博士学位,2011年至2013年为中国科学技术大学博士后,2015年至2016年为美国加州大学圣地亚哥分校(UCSD)纳米工程系访问学者,主要从事飞秒激光加工技术、三维生物打印技术及应用、微纳功能表面及功能器件、结构色机理及加工方法等方面的研究。E-mail: jwl@ustc.edu.cn