

聚二甲基硅氧烷-纸复合微流控芯片上的肝癌细胞三维培养

张琼 周小棉 严伟 梁广铁 张其超 刘大渔*

(广州医学院附属广州市第一人民医院检验科研究室, 广州 510180)

摘要 研发了一种聚二甲基硅氧烷-纸复合型微流控芯片用于肝癌细胞三维培养。芯片使用明胶处理硝酸纤维素薄膜作为细胞培养基底,以水凝胶网格作为三维培养支撑。结合微通道主动灌流与水凝胶中的被动扩散,模拟体内的流体运输形式实现细胞与外界物质交换。实验结果显示,芯片上的液滴生成以及细胞定位种植简便可靠。连续监测显示肝癌 HepG₂ 细胞在水凝胶微球中增殖形成类似组织的三维结构。细胞增殖动力学分析以及生化检测结果显示了芯片三维培养与二维培养的差别。这种芯片三维细胞培养方法操作简便可靠,仿真度高,适合于肿瘤细胞研究。

关键词 微流控芯片; 薄膜; 三维细胞培养; 水凝胶; 肝癌

1 引言

体外细胞培养的核心技术问题是模拟体内微环境,使细胞测试结果真实反映体内状态。传统的二维(2D)细胞培养在微环境模拟方面存在不足,如细胞-细胞间联系的减弱以及细胞-基质间相互作用的丧失等^[1]。三维(3D)细胞培养技术的出现克服了 2D 技术的上述不足。3D 培养以具有三维结构的材料为载体支撑细胞在立体空间中生长,建立了细胞-细胞间的联系并使细胞能够分化产生具有组织特征的结构。除了细胞间的相互联系,微环境中细胞与间质的相互作用以及流体运输方式的模拟也是 3D 培养中需要考虑的问题。因此,发展创新 3D 培养技术,以实现对于微环境的细致模拟,是细胞研究中有待解决的重要问题。

微流控芯片技术的发展带来了细胞研究平台的革新,其特点是在微小尺寸下实现功能单元的灵活组合与规模集成^[2~5]。前期研究报道的微流控细胞分析系统,在分析通量、速度、自动化程度及运行消耗方面较传统平台显示出巨大优势^[5~8]。对于基于微流控系统的细胞研究,一个重要方向就是细致模拟体内微环境^[3,4],即需要考虑到细胞-细胞、细胞-间质的相互作用,以及细胞与外界的物质交换形式。前期报道^[8~11]显示,微流控芯片平台可实现简便高效的 3D 培养以有效模拟体内微环境。

除了结构形式的仿真,微流控技术还可以通过材料选择和结构设计模拟细胞间质的结构和功能。间质的模拟需要考虑材料的物理性质和化学成分,从而使其更接近于体内状态。Martinez 等提出了“纸芯片”技术^[12],即在微流控芯片中使用纸作为分子扩散的媒介,以及细胞培养的支撑。纸材料具有良好的生物兼容性和通透性,并且便于修饰,是理想的细胞培养材料。近期研究中,纸材料在细胞培养中的应用取得了良好效果^[10,13]。

本研究建立了一种基于聚二甲基硅氧烷(Poly-dimethyl siloxane, PDMS)-纸复合型微流控芯片的 3D 细胞培养方法。实验设计并制作了一种封装有纸的芯片,利用纸与 PDMS 表面性质的差异,在纸片上形成水凝胶液滴。液滴固化形成的水凝胶微球作为 3D 细胞培养器,模拟肿瘤实质;而用细胞外基质成分处理的纸片以及与其表面的水凝胶支持和营养细胞,模拟肿瘤间质。此外,结合液体在微通道中的主动灌流与纸材料中的被动扩散模拟体内物质运输形式,形成浓度梯度介导的细胞-微环境相互作用。实验考察了芯片上水凝胶液滴的形成与固化过程,并以肝癌 HepG₂ 细胞为模型,验证了这种芯片 3D 培养方法的效果。

2011-12-22 收稿;2012-03-07 接受

本文系国家自然科学基金(No. 81171418)、国家国际科技合作项目(No. 2010DFB33880)和广州市医药卫生科技项目(Nos. 2009-ZD-

19042009)ZD-F11, 201102A213046 和 201214021002)资助。Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

* E-mail: dylu@foxmail.com

2 实验部分

2.1 芯片加工

微流控芯片(图 1)包含 3 层结构。顶层含平行进样通道(长 3.5 cm,宽 140 μm ,高 160 μm)。中间层厚度 200 μm ,底面有一系列直径 2.2 mm 的圆形凹槽,凹槽中央为直径 1.8 mm 的通孔,作为细胞培养池。底层是平板玻璃,中间层与底层结合将直径 2 mm 的纸片封装于中间层底面凹槽内。芯片中 PDMS 部分使用传统的标准软刻蚀方法^[8]进行加工。制作好的 PDMS 层表面等离子处理后,将中层与底层封接。中间层封装的纸片依次用 0.1% 明胶和 2% 海藻酸钠溶液处理并烘干,之后将芯片顶层与中间层封接,获得完整芯片。

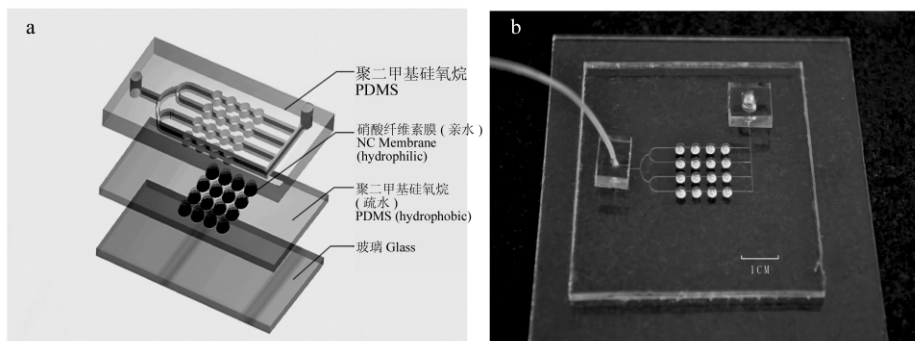


图 1 PDMS-纸复合微流控芯片结构示意图(a)与实物图(b)

Fig. 1 Poly-dimethyl siloxane (PDMS)-paper hybrid microfluidic chip for 3D (three dimensional) cell culture

(a) Diagram showing the PDMS-paper hybrid microfluidic chip; (b) Photograph of the paper embedded microchip connected with a Teflon capillary.

2.2 仪器与试剂

IX71 倒置荧光显微镜,IX81 激光共聚焦显微镜,AU2700 全自动生化分析仪(Olympus 公司); TS-2A 微量注射泵(保定兰格公司)。PDMS 前体及引发剂(美国 Dow Corning 公司); HepG₂ 肝癌细胞株(中山大学肿瘤医院提供); 不同孔径硝酸纤维素(Nitrocellulose, NC)薄膜(英国 Whatman 公司); PBS、1640 培养基、明胶及胰蛋白酶溶液(美国 Sigma 公司); 吖啶橙(Acridine orange, AO)和溴化乙锭(Ethidium bromide, EB)购自美国 Amresco 公司; 荧光染料用 PBS 配制, AO/EB 工作液中两种染料含量均为 2.5 $\mu\text{g/L}$ 。海藻酸钠、台盼兰、CaCl₂ 及琼脂糖(上海生工公司)。

2.3 芯片实验操作

芯片和聚四氟乙烯毛细管在使用之前,80 烘烤 1 h。微量注射器在 75% 酒精中浸泡 6 h 后,用灭菌蒸馏水冲洗 3 次。使用前,芯片、毛细管和注射器均置于紫外灯下照射。使用时,在超净工作台上将芯片与微量注射器通过毛细管连接。

HepG₂ 细胞在培养瓶中培养,进入指数生长期后收获,并制成密度为 $2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液。微量注射泵抽取 20 μL 细胞悬液,从芯片进样通道缓慢注入。排出剩余细胞悬液后,芯片静置于培养箱中 2 h,向通道引入 2% CaCl₂ 溶液,引发海藻酸钠聚合,之后以 32 $\mu\text{L/h}$ 流速灌注培养。平行进行的 2D 芯片细胞培养采用与 3D 培养相同尺寸的培养池,相同密度的细胞悬液引入通道后,在培养池中静置 8 h 后开始灌注培养。

2.4 芯片培养细胞形态和结构检测

细胞在芯片上培养 1, 5, 9 和 13 d 后,向芯片通道中引入 AO/EB 染液。染色 10 min 后,使用激光共聚焦显微镜检测,观察水凝胶内部细胞的形态结构。

将灌注培养 5d 的水凝胶微球从芯片中取出,按文献^[14]的方法,用 3% 低熔点琼脂糖包裹,进行常规石蜡包埋,切片、染色后,再进行形态学观察。

2.5 细胞生存和代谢分析

从芯片内取出含有细胞的水凝胶微球,加入离心管,滴加生理盐水溶解水凝胶,离心后去除上清液,胰酶消化细胞团,并将细胞重悬于 100 μL PBS 液中。混匀的细胞悬液滴加在计数板上,分别计数培养 1, 5, 9 和 13 d 后的细胞数,并计算所对应的细胞密度。同时,吸取部分细胞悬液与台盼兰染液混合,计数活细胞和死细胞数目,细胞存活率 = 活细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

在培养 1, 3 和 5 d 后,分别收获 2D 和 3D 培养细胞,并收集 12 h 灌流液。此外,将收获细胞制成相同浓度的细胞悬液,洗涤,取等量细胞悬液加入含有裂解剂的离心管,冰上裂解 10 min,离心,上清液即为细胞裂解液。对灌流液和细胞裂解液进行生化分析。灌流液分析指标包括葡萄糖、尿素氮和白蛋白;细胞裂解液分析指标为白蛋白。

3 结果与讨论

3.1 微流控芯片设计

本研究所采用的微流控芯片细胞培养方法,以亲水性纸材料上形成的水凝胶微球为 3D 细胞培养器,模拟肿瘤实质。选用具有良好生物兼容性的 NC 膜及明胶-海藻酸钠水凝胶容纳和支持细胞,有效模拟肿瘤间质结构,以建立细胞-间质相互作用。海藻酸钠具有接触 Ca^{2+} 聚合,接触 EDTA 或 Na^+ 溶解的特性,便于实验操作。芯片灌流培养结合了通道内主动运输与水凝胶中的被动扩散,模拟体内流体运输形式,以实现细胞与外界的物质交换。这种物质运输形式不仅避免了细胞直接暴露于流体剪切力,而且可以通过分子扩散形成细胞团内的物质梯度浓度分布。

3.2 纸材料的选择和表面处理

实验采用 NC 膜作为水凝胶微球 3D 培养器的基底材料。NC 膜质地均匀,表面光滑,不仅可以保证不同细胞培养池结构的一致性,还便于芯片各层的紧密封接。测试了孔径为 0.45、1.0 和 5.0 μm 的 NC 膜,剪裁后经明胶处理封装于芯片中。实验表明,NC 膜亲水性良好,便于进行明胶吸附和固定;大孔径薄膜吸水量较多,经溶液处理和烘干后变形较明显。因此,本实验选择孔径 0.45 μm NC 膜作为芯片材料。培养结果显示,细胞在 0.45 μm 孔径薄膜上生存状态良好。

3.3 芯片上水凝胶液滴形成和固化

明胶处理后的 NC 膜具有亲水性,在整体疏水的 PDMS 中形成局部亲水区。向通道中引入细胞悬液时,由于表面张力及重力作用,细胞悬液迅速润湿薄膜并充满培养池。细胞悬液流过直通道后,在串联纸片上形成一系列液滴(图 2)。纸片上预先沉积的海藻酸钠被溶解进入细胞悬液,引入 CaCl_2 溶液后,接触 Ca^{2+} 的液滴固化形成水凝胶微球。水凝胶微球既提供 3D 细胞培养所需的疏松网格状支撑结构,又起到保护和固定作用,避免流体剪切力对细胞的伤害。本实验通过纸片上水凝胶液滴的形成和固化,在微流控芯片上实现了细胞定位种植,并建立了 3D 培养。

3.4 芯片上 3D 细胞结构的形成

为证实芯片培养中细胞-细胞以及细胞-间质相互作用的形成,对 HepG₂ 细胞进行了形态学和粘附力分析。

激光共聚焦显微镜观察显示,水凝胶中的肝癌细胞在种植 5 d 后形成大小不等的微球结构。随培养天数增加,细胞微球体积不断增大(图 3a~d)。组织切片分析显示,芯片 3D 培养肝细胞形成多个团块状微球。细胞间结合紧密,排列呈条索状。肝癌细胞核较大,提示细胞代谢旺盛并有较强增殖能力(图 3e)。上述形态学分析结果显示,芯片培养环境适宜细胞生存和增殖。芯片培养建立了细胞-细胞间的联系,形成了类组织的 3D 结构。

考察了肝癌细胞在不同材料表面的贴壁和粘附情况以验证细胞与间质的作用(图 4)。所用芯片通道底面分别是未处理 PDMS、未处理 NC 膜和明胶-海藻酸钠处理 NC 膜。HepG₂ 细胞引入通道后培养 8 h,细胞形态改变的计数结果显示,PDMS 表面贴壁细胞仅占 2.8%,未处理 NC 膜和水凝胶处理 NC 膜上贴壁细胞比例分别为 55.6%和 97.1%。以 1 mm/s 的流速灌流 1 h 后,PDMS 通道表面几乎没有细胞存留,未处理和水凝胶处理 NC 膜上存留细胞比例分别为 4.1%和 39.8%。上述结果说明, HepG₂ 细胞与 NC 膜表面固定的基质成分相互作用促进了细胞的贴壁和粘附,其原因是吸附明胶和海藻酸钠的 NC 膜表面含有选择素(Selectin)和整合素(Integrin)成分,模拟了细胞间质结构。这些基质

成分与细胞表面相应受体结合,从而在芯片 3D 培养中建立了细胞-间质相互作用。

3.5 3D 培养肝癌细胞的生长和代谢

细胞存活率测试结果显示,1, 5, 9 和 13 d 时细胞生存率均大于 90%;连续监测发现,细胞密度分别为 3.9×10^3 , 1.2×10^4 , 2.9×10^4 和 $9 \times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$ 。微球中细胞总数持续增加提示细胞在水凝胶间隙中不断增殖,芯片 3D 培养条件下的肝癌细胞在种植后 13 d 内保持增殖状态,其倍增时间约为 4 d。相比较 2D 培养(倍增时间约 1 d),3D 环境中由于生长空间和养分供应限制造成细胞增长率相对较低,比较接近体内肿瘤细胞增殖的模式。

细胞裂解液分析结果显示,培养 1, 3 和 5 d 后 2D 培养肝癌细胞浆中白蛋白含量分别为 2.4, 2.7 和 3.0 mol/L,而 3D 培养细胞的对应结果为 3.1, 3.6 和 3.9 mol/L,二者有差别但不显著。细胞培养液生化分析(表 1)显示,2D 和 3D 培养细胞尿素氮释放水平非常接近,但 3D 培养灌流液中葡萄糖含量显著高于 2D 培养。此结果提示,2D 和 3D 培养细胞氨基酸代谢率接近,而 3D 培养细胞葡萄糖利用率不及 2D 培养细胞。这可能是因为扩散限制影响了 3D 培养细胞对葡萄糖的摄取,符合体内肿瘤内部养分供应

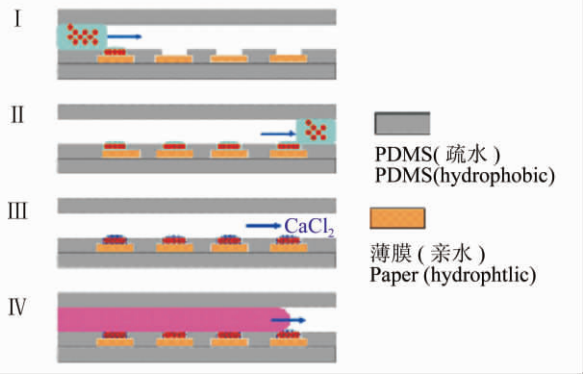


图 2 图示说明芯片细胞培养

Fig. 2 Illustration of cell culture on microfluidic chip (I)细胞悬液引入通道,在重力及表面张力作用下,溶液迅速浸润纸片;(II)溶液流过时在纸片上形成液滴;(III)将 CaCl_2 引入通道, Ca^{2+} 引发海藻酸钠聚合形成水凝胶微球;(IV)将培养基引入通道进行灌流培养。

(I) Cell suspension is introduced into a microchannel with embedded paper chips. The liquid quickly wet the paper due to the effects of gravity and surface tension at the liquid-solid interface;(II) When the cell suspension flows away, droplets are formed on the paper;(III) Gelating the hydrogel droplets by flowing CaCl_2 solution into the channel;(IV) Continuous perfusion cell cultures.

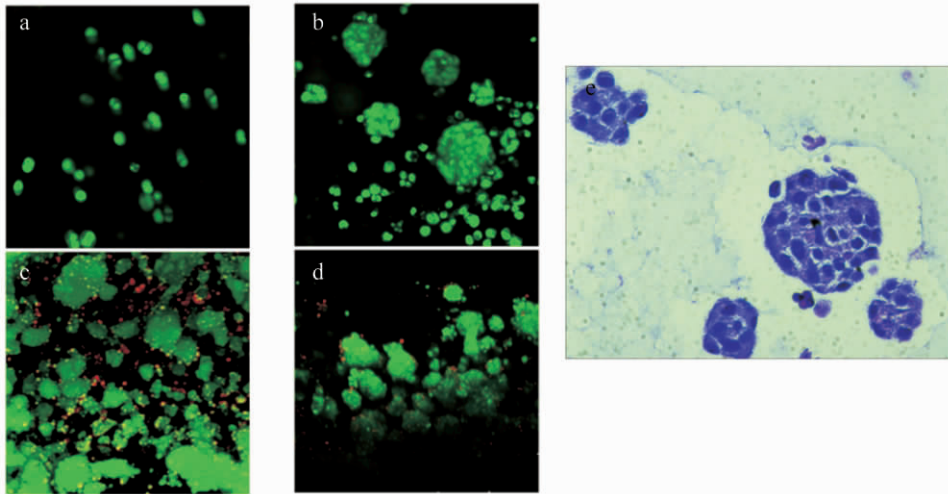


图 3 图 a~d 激光共聚焦扫描 1,5,9 和 13 d 时水凝胶微球中肿瘤组织的形态(放大倍数 10×10),e 芯片培养 5 d 时水凝胶中肿瘤细胞石蜡包埋切片 HE 染色观察图(放大倍数 10×40)。

Fig. 3 Photo a~d are images of confocal laser scanning at day 1, 5, 9 and 13, showing morphology of cancer cells cultured in the hydrogel beads (10×10). Photo e is the observation of the slide made from the paraffin-embedded hydrogel microbeads (10×40)

相对不足的实际情况。此外,3D 培养灌流液中白蛋白含量明显高于 2D 培养,结合细胞裂解液分析结果可以发现,2D 培养肝癌细胞白蛋白生成能力的降低主要因为分泌障碍,而非合成能力的下降。白蛋白的合成与分泌是肝细胞的主要生理功能,而 3D 培养肝癌细胞所形成的细胞间隙是白蛋白分泌的必须条件。

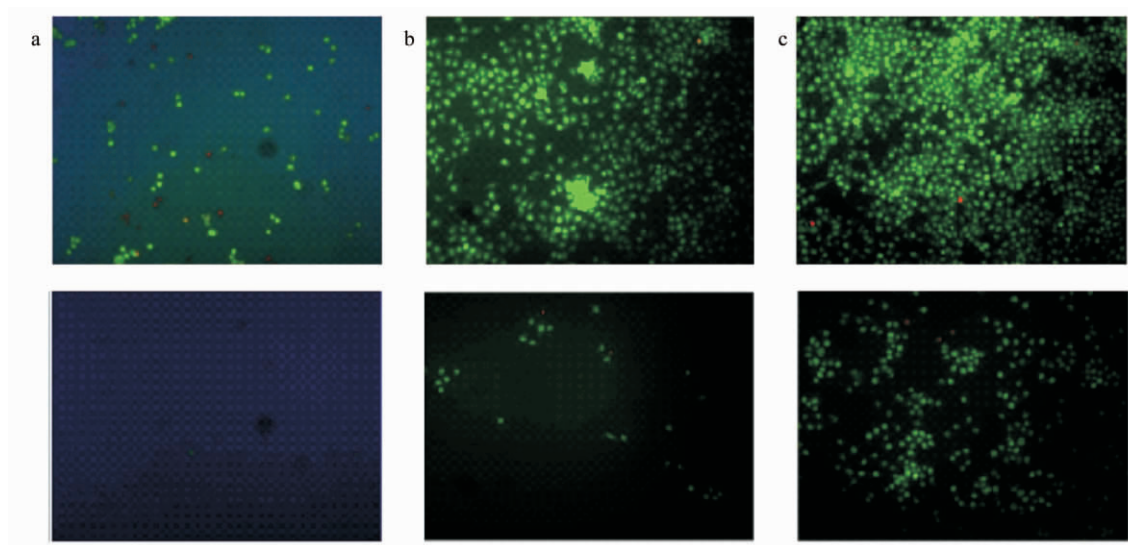


图 4 HepG₂ 细胞在芯片通道静置 8 h 后连续灌流 1 h, 比较灌流前(上)与灌流后(下)贴壁细胞数量的改变以考察细胞在不同材质表面的粘附能力。细胞贴附材质: a. PDMS; b. 未处理 NC 膜; c. 明胶-海藻酸钠处理 NC 膜(荧光显微镜拍摄, 放大倍数 10×10)。

Fig. 4 HepG₂ cells were settled down in microchannel for 8 h before being exposed to the perfusion flow. Cell adhesion on different kinds of materials were investigated by comparing the number of cells before (above) and after (below) the perfusion. The substrates used were: a. PDMS, b. untreated nitrocellulose (NC) membrane, and c. NC membrane treated with gelatin and sodium alginate.

4 结 论

发展了一种包含纸材料的复合型微流控芯片, 用于肝癌细胞 3D 培养。此方法以细胞外间质成分处理的纸材料作为细胞培养基底, 纸片表面形成水凝胶微球为 3D 培养器, 构

建了包含细胞-细胞及细胞-间质相互作用的肿瘤微环境。结合微通道主动灌流与水凝胶中的被动扩散模拟体内物质运输形式, 实现细胞与外界的物质交换。结合芯片内部设计与外部控制, 将细胞研究所涉及的一系列操作在芯片平台上集成, 减少外界对细胞培养环境的干扰。通过上述改进, 保证细胞在类似体内条件的芯片微环境中生长。实验以肝癌细胞为模型体系, 考察了芯片系统的基本性能。结果显示这种芯片适宜于肝癌细胞生存与增殖, 并可以形成类似组织的 3D 结构, 其生长和代谢接近体内肿瘤情况。这种芯片 3D 细胞培养方法操作简便可靠, 仿真度高, 适合于肿瘤细胞研究。

表 1 2D 和 3D 培养灌流液中葡萄糖、尿素氮和白蛋白水平的比较

Table 1 Comparison of glucose, urea nitrogen and albumin levels in perfusion waste in 2D and 3D cultures

培养天数 Culture Days	葡萄糖 Glucose(mmol/L)		尿素氮 Urea nitrogen(mmol/L)		白蛋白 Albumin (g/L)	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D
	1	8.76	22.45	1.15	1.1	0.85
3	7.72	21.26	1.05	0.9	0.85	2.4
5	3.13	19.31	1.15	1.3	0.8	2.8

References

- 1 Yamada K M, Cukierman E. *Cell*, **2007**, 130(4): 601~610
- 2 El-Ali J, Sorger P K, Jensen K F. *Nature*, **2006**, 442(7101): 403~411
- 3 Park J Y, Takayama S, Lee S H. *Integr Biol (Camb)*, **2010**, 2(5-6): 229~240
- 4 Young E W, Beebe D J. *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39(3): 1036~1048
- 5 Liu D, Wang L, Zhong R, Li B, Ye N, Liu X, Lin B. *J. Biotechnol*, **2007**, 131(3): 286~292
- 6 Wu M H, Huang S B, Lee G B. *Lab Chip*, **2010**, 10(8): 939~956
- 7 Ye N, Qin J, Shi W, Liu X, Lin B. *Lab Chip*, **2007**, 7(12): 1696~1704
- 8 Yu L, Chen M C, Cheung K C. *Lab Chip*, **2010**, 10(18): 2424~2432
- 9 Wong A P, Perez-Castillejos R, Christopher Love J, Whitesides G M. *Biomaterials*, **2008**, 29(12): 1853~1861

- 10 Derda R, Laromaine A, Mammoto A, Tang S K, Mammoto T, Ingber D E, Whitesides G M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, 106(44): 18457~18462
- 11 Liu T, Lin B, Qin J. *Lab Chip*, **2010**, 10(13): 1671~1677
- 12 Martinez A W, Phillips S T, Whitesides G M, Carrilho E. *Anal. Chem.*, **2010**, 82(1): 3~10
- 13 Derda R, Tang S K, Laromaine A, Mosadegh B, Hong E, Mwangi M, Mammoto A, Ingber D E, Whitesides G M. *PLoS One*, **2011**, 6(5): e18940
- 14 WU Hui-Xi, HU Rui-De. *Chinese J. Clinical and Experimental Pathology*, **1999**, 15(3): 272~273
吴惠茜, 胡瑞德. 临床与实验病理学杂志, **1999**, 15(3): 272~273

Three Dimensional Cultures of Liver Cancer Cell on a Poly(dimethyl siloxane)-Paper Hybrid Microfluidic Chip

ZHANG Qiong, ZHOU Xiao-Mian, YAN Wei, LIANG Guang-Tie, ZHANG Qi-Chao, LIU Da-Yu*
(Department of Laboratory Medicine, Guangzhou First Municipal People's Hospital,
Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510180, China)

Abstract We developed a Polydimethylsiloxane (PDMS)-paper hybrid microfluidic chip for three-dimensional (3D) culture of HepG₂ cell, in which gelatin-treated nitrocellulose membranes were used as base of cell culture, and hydrogel grids were generated to serve as skeleton for 3D cultures. The fluid transportation combined active perfusion along the microchannel and passive diffusion through the extracellular matrix, which closely mimic the exchange of extracellular fluid and microenvironmental substance in-vivo. Experimental results demonstrated that droplet generation, cell seeding and cell localization on the paper-embedded microchip can be achieved easily and reliably. Under continuous perfusion and monitoring, the liver cancer cells cultured in 3D matrix proliferated and spontaneously aggregated to form tissue-like 3D structures. Studies have shown that the cells grown in 3D differ considerably compared to 2D, proved by growth dynamics and biochemical tests. The microchip-based 3D cell culture features simplicity and precise emulation of the microenvironment in-vivo, and is thus well suited to various kinds of tumor cell research.

Keywords Microfluidic chip; Membrane; Three-dimensional cell culture; Hydrogel; Liver cancer

(Received 22 December 2011; accepted 7 March 2012)

瑞宁移液器达人全国挑战赛拉开战幕

瑞宁移液器达人全国挑战赛自 2 月启动以来,从华东,华北,华南再到华中及华西已累计举办十余场!在各赛区现场,不仅有 Rainin 专业人员对参赛选手进行良好移液操作的指导,也有专业校准人员现场为移液器(不限品牌)进行测漏及日常性能测试。参赛选手们更是跃跃欲试,争相在现场进行操作。

凡现场参与瑞宁举办的 GPP 移液器达人全国挑战赛,使用指定的移液器移取目标量程,我们将根据参赛者结果按移液准确性和重复性进行排名,有机会赢取精美礼品。最终的成绩将计入全国排名,有机会赢取上海总决赛的资格,去美国奥克兰亲眼看一下移液器及吸头的生产过程!去看看旧金山海景!来参加我们的 Rainin 移液器达人全国挑战赛吧!

欲了解移液器达人全国挑战赛具体信息和参赛时间和地点,请登陆瑞宁官方微博: www.weibo.com/pipette。

美国 RAININ 公司(Rainin Instrument, LLC)成立于 1963 年,生产基地设在美国加州奥克兰,是梅特勒-托利多集团下属的一家子公司。