

文章编号:1004-7220(2011)04-0335-06

· 论 著 ·

## 浓度与压力梯度可调的三维细胞 培养微流控芯片的研制

卢斯媛, 蔡绍哲, 戴小珍, 陈思佳, 宋 振

(重庆大学 生物工程学院, 重庆大学生物流变科学与技术教育部重点实验室, 重庆 400044)

**摘要:** **目的** 制作化学浓度梯度与压力梯度可调的细胞三维培养微流控芯片, 构建可模拟在体细胞生长所处动态微环境的体外模型。 **方法** 利用光刻成型技术、模塑法以及等离子键合工艺, 制作3通道结构的微流控细胞培养芯片。通过微注射泵控制微通道内溶液流动生成浓度梯度, 利用液面高度差生成压力梯度, 并通过骨架染色比较二维培养与三维培养下的细胞形态。 **结果** 获得了化学浓度梯度与压力梯度可调的微流控细胞培养芯片。在  $2 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速下, 中间通道的浓度梯度3 h后可达到相对稳定。100 Pa的压力差在中间通道生成的视在压力梯度为  $0.11 \text{ Pa}/\mu\text{m}$ , 从而驱动三维支架内间隙渗流的生成。并在微流控芯片内实现脐静脉内皮细胞稳定的三维培养。 **结论** 该芯片结构简单, 制作方便, 能灵活调控细胞生长所处的微环境, 可进一步用于研究不同的微环境参数对细胞行为的影响。

**关键词:** 微流控芯片; 微环境; 细胞培养; 浓度梯度; 间隙渗流; 压力梯度

中图分类号: R 318 文献标志码: A

## Development of microfluidic chip with adjustable concentration and pressure gradient for 3D cell culture

LU Si-yuan, CAI Shao-xi, DAI Xiao-zhen, CHEN Si-jia, SONG Zhen (Key Laboratory of Biorheological Science and Technology, Ministry of Education, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

**Abstract: Objective** To develop a microfluidic device with the adjustable concentration and pressure gradient for 3D cell culture in hydrogel and set up an *in vitro* model with the capability to closely simulate *in vivo* microenvironment for cell growth. **Methods** The microfluidic chip, with a middle channel for 3D cell culture and two-side channels for delivering cell culture medium, was designed and fabricated using standard soft lithography and replica molding techniques. Its capability to generate concentration gradient, interstitial flow and image cell *in situ* was demonstrated. **Results** A simple microfluidic chip for 3D cell culture in hydrogel with the capability to generate the concentration and pressure gradient was obtained. At a flow rate of  $2 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  in each side channel, the concentration gradients remained constant after 3 h. The interstitial flow across the gel scaffold was generated by a 100 Pa pressure difference between two-side channels with the pressure gradient of  $0.11 \text{ Pa}/\mu\text{m}$ . Human adult dermal microvascular endothelial cells (HMVEC) were maintained in 3D culture with collagen type I and observed with confocal microscopy. **Conclusions** The microfluidic chip is simple and easy to operate and it can simulate the complicated microenvironment *in vivo*. The chip also allows the multiparameter control of microenvironment, facilitating the better understanding of interaction between cells and microenvironment.

**Key words:** Microfluidic chip; Microenvironment; Cell culture; Concentration gradient; Interstitial flow; Pressure gradient

收稿日期:2011-01-16; 修回日期:2011-03-01

基金项目:国家自然科学基金资助项目(10872224)。

通讯作者:蔡绍哲, E-mail: sxcai@cqu.edu.cn。

细胞迁移、分化、增殖和凋亡等行为与机体生命活动中的免疫防御、损伤修复、血管新生以及肿瘤转移等许多重要生理和病理过程密切相关,而细胞的这些行为很大程度上是受到其所处的微环境的调控的。细胞所处的微环境是一个多因素经过精细整合的复杂的动态生境<sup>[1]</sup>,这些因素可概括为:①生化因子浓度及浓度梯度的作用;②各种力学因素的作用,包括通过调控渗流影响细胞行为;③细胞所处的三维微尺度空间,细胞与细胞之间、细胞与胞外基质之间相互作用。微环境中任一因素的变化都可能会对细胞行为和功能的发挥产生重要的影响。然而传统的细胞体外培养,只能提供一种静态的、宏观的、二维的细胞生长环境,不足以模拟相对真实的发生生物学或生理学事件的环境,从而导致许多体外研究结果与实际情况相差甚远<sup>[2-3]</sup>。

20世纪90年代初发展起来的微流控芯片技术,通过在芯片上制成微米级通道,并整合入各种微元件精确控制微量流体的压力、流量和流动方向,从而实现样品制备、进样、样品分离以及各种生化反应的精确控制。将微流控芯片连接上电子显微镜或者荧光分析仪等各种外部检测设备,还可以进行实时监控和结果分析。将微加工技术和细胞培养技术相结合,可以很好地模拟细胞体内微环境<sup>[4-10]</sup>。Toh等<sup>[11]</sup>利用微芯片技术实现 HepG2、MCF7 癌细胞系的三维培养,发现肝细胞和骨髓间充质干细胞具有良好的三维细胞骨架结构,而且保持了特异性和分化能力。Cheng等<sup>[12]</sup>用琼脂糖水凝胶制成一种能够生成稳定的化学浓度梯度的微流控装置用于进行细胞趋化性实验,并描绘了细胞在迁移过程发生的形态变化,但该装置仅能单因素考察微环境对细胞行为的影响。Vickerman等<sup>[4]</sup>构建了一个多参数调控微环境的微流控装置研究血管生成机制,发现促血管生长因子梯度分布和间隙渗流对血管管腔结构的形成都有重要作用,然而该装置的水凝胶灌注需要借助显微机械手,操作较为繁琐。

本研究在前人工作基础上,构建了一种灌胶简便的微流控芯片,用于细胞的三维培养,并可实现多参数调控细胞微环境,用于研究细胞不同的应激反应。同时,还考察了该芯片形成稳定的浓度梯度和压力梯度的效果,为微流控芯片用于细胞微环境调控的研究进行了有益的尝试。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

SU-8 硅模板(重庆大学微机电系统中心,中国)。注射泵(保定兰格有限公司,中国)。Sylgard 184 型聚二甲基硅氧烷(PDMS)预聚体及固化剂(Dow Corning 公司,美国)。I型胶原(BD公司,美国)。荧光染料,分子量 10 kDa (Sigma-Aldrich 公司,美国)。人脐静脉内皮细胞株(购自中科院细胞库)。DMEM 培养基(GIBCO,美国)。PBS 缓冲液(博士德,中国)。牛血清/胎牛血清(Hyclone 公司,德国)。胰蛋白酶(Hyclone 公司,德国)。FITC 标记的鬼笔环肽(Sigma 公司,美国)。倒置荧光显微镜(Olympus 公司,日本)。

### 1.2 方法

**1.2.1 微流控芯片的设计** 为满足细胞的三维培养,并且对细胞产生浓度梯度的刺激,以及由压力梯度从而生成间隙渗流,本研究设计了一个由3通道组成的微流控芯片构型,整个微通道的高度为220  $\mu\text{m}$ 。中间通道用于细胞三维支架的构建,宽为400  $\mu\text{m}$ ,2个旁通道用于细胞培养液的更新、生化因子的浓度梯度以及压力梯度的生成,宽均为500  $\mu\text{m}$ ,旁通道与中间通道之间分别由4个斜型微横桥连接,微横桥直径为250  $\mu\text{m}$ ,作用是实现细胞与培养基的物质交换,以及施加对细胞的物理化学刺激。同时由于微横桥的尺寸较小,通过毛细力的作用避免了水凝胶渗溢到旁通道中造成堵塞。

**1.2.2 微流控芯片的制作** 利用SU-8的光刻成型技术制作具有凸起微通道结构的SU-8硅模板(见图1(a));将PDMS预聚体与固化剂按照重量比10:1均匀混合,真空抽气去除气泡后,倒于SU-8硅模板上,60  $^{\circ}\text{C}$ 烘箱放置2 h,待PDMS固化后,将带有微通道结构的部分切割成20 mm  $\times$  45 mm的矩形,并从硅模板上剥离(见图1(b))。将切割下来的PDMS片和载玻片同时放入等离子清洗器中,其中PDMS片带通道图样的面朝上,在25 W微波功率和26 Pa氧压下,处理20 s后,立即将PDMS片和载玻片取出并将待键合面贴合在一起,轻度挤压,去除贴合面间的气泡,使两键合面紧密贴合(见图1(c)~(d)),并分别在通道各出入口处打孔,制成微流控芯片(见图2),灭菌后备用。

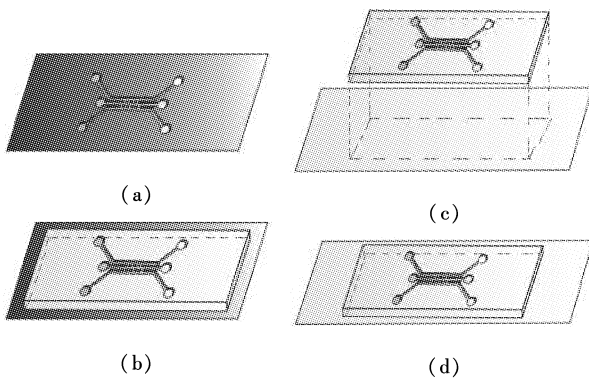


图1 微流控制作流程

Fig.1 Fabrication process for the microfluidic chip

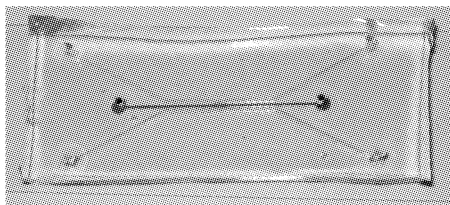


图2 微流控芯片的实物图

Fig.2 Photograph of the final microfluidic chip

**1.2.3 微流控芯片内水凝胶的灌注** 将I型胶原原液与10×DMEM培养液,PBS缓冲液,NaOH溶液混合,制成约3 g/L的胶原预聚溶液。将预聚液充分混合好后立即在室温下从中间通道的入口处轻轻注入,使胶原填满中间的通道以及两边的8个微横桥(见图2,其中胶原加入蓝色染料以便于观察),在37℃下聚合30 min,使其完全聚合后,放入4℃的冰箱中备用。

**1.2.4 微流控芯片内浓度梯度和压力梯度的表征** 将微通道在PBS溶液中平衡30 min。将新配制的0.1 mmol·L<sup>-1</sup>的荧光素的PBS溶液用微注射泵以2 μL·min<sup>-1</sup>的流速从其中1条旁通道入口注入,同时另一旁通道以2 μL·min<sup>-1</sup>的流速注入PBS液。以注入荧光素的那一刻计时,利用荧光显微镜每隔5 min拍照一次,共观察9 h。最后用Matlab软件对中间通道的浓度梯度分布取不同时间点进行分析。

本研究实现压力梯度的原理为通过调节4个出口的储液池液面高度差,在中间通道的三维支架内形成压力梯度。为了使体积更加可观,实验中分别采用红、蓝染料加入PBS中(见图3),平衡2.5 h后,形成较稳定的压力差。将两边通道液面的高度差控制在10 mm,根据压强公式 $p = \rho gh$ 可求出中间

通道的压力差为100 Pa。在实验中,为了避免水分蒸发,在4个储液池液面分别接入液态石蜡进行封闭。将芯片置于高湿度的孵箱内,每隔2 h测量1次液面高度,测量72 h。

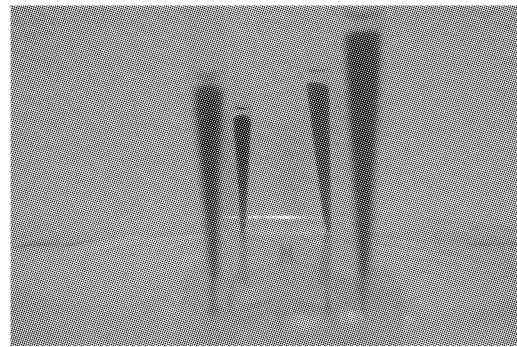


图3 微通道内压力梯度加载示意图

Fig.3 Demonstration of pressure gradient across the middle channel

**1.2.5 芯片内细胞的三维培养和骨架染色** 细胞接种于DMEM培养基中,含10%胎牛血清,于37℃、5%CO<sub>2</sub>及饱和湿度的培养箱中孵育,2~3 d换液1次。贴壁生长的细胞长满90%时,经0.25%胰蛋白酶消化,然后将对数生长期细胞用于实验。

将I型胶原原液与10×DMEM培养液,PBS缓冲液混合,制成约3 g/L的胶原预聚溶液。将细胞从培养瓶中消化下来,用培养基制成细胞悬液,将预聚液与细胞悬液混合均匀,细胞密度控制在10<sup>6</sup>/mL,立即将细胞和I型胶原混合液在室温下从中间通道的入口处轻轻注入,使细胞-I型胶原混合液填满中间的通道以及两边的8个微横桥,在37℃下聚合30 min,使其完全聚合后,连接注射泵持续换液,放入孵箱中培养(见图7)。

24 h后用FITC-鬼笔环肽进行细胞骨架染色。步骤如下:预温PBS(37℃)清洗细胞2次,每次10 min;4%多聚甲醛室温固定5~10 min,PBS清洗细胞3次;0.1% Triton X-100/PBS室温破膜3~5 min,PBS清洗细胞3次;5 μL FITC-鬼笔环肽贮存液加入150 μL PBS中配成工作液(5 μg/mL)并用以染细胞,室温染色30~60 min;PBS清洗细胞3次;吸去多余水分,加荧光封片液封片,荧光显微镜下观察,并拍照。用上述方法对普通培养瓶培养细胞进行骨架染色,用作对照实验。

## 2 结果与讨论

### 2.1 微流控芯片的键合工艺

PDMS 的表面性能对其与玻璃片的键合有着重要的影响。PDMS 材料本身是疏水的(接触角约为  $110^\circ$ ),利用空气等离子体对 PDMS 表面进行处理后,会导致其表面性质发生巨大的变化。本实验利用接触角分析仪对等离子处理后不同时间的 PDMS 表面接触角进行了测试,从而分析 PDMS 表面浸润

特性的变化。结果显示,经等离子处理后 PDMS 表面对水几乎完全浸润,水滴一旦与其接触即铺展在其表面。然而经过一段时间静置后,PDMS 表面的疏水特性会逐渐恢复(1 h 后接触角约为  $40^\circ$ ,2 h 后约为  $108^\circ$ ),大约 2 h 恢复为初始状态(见图 4)。该结果表明,在对 PDMS 和玻璃片进行等离子处理后,需要迅速将两者封接,否则容易出现封装不牢而引起漏液。

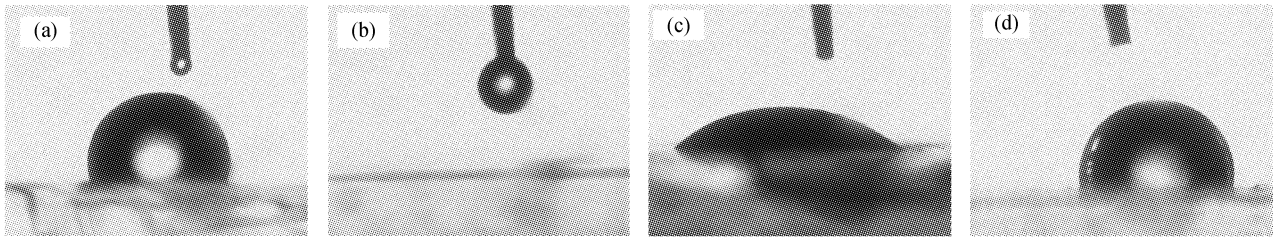


图4 PDMS 表面接触角的测量 (a)处理前,(b)处理后 1 min,(c)处理后 1 h,(d) 处理后 2 h

Fig. 4 Measurement of the surface contact angle of PDMS (a) Before modification, (b) 1 min after modification, (c) 1 h after modification, (d) 2 h after modification

### 2.2 微流控芯片内浓度梯度和压力梯度的形成

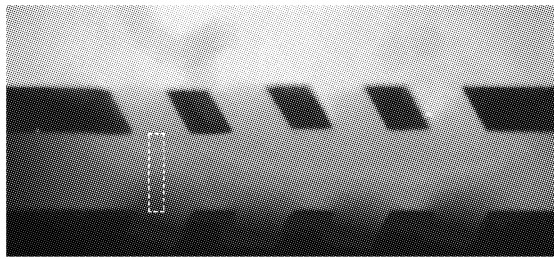
**2.2.1 微流控芯片内浓度梯度的表征** 微流控芯片内生化学因子浓度梯度的形成机制是浓度差异引起的生化因子由高浓度向低浓度的扩散效应。本实验采用荧光染料为指示剂对中间通道内生成的浓度梯度进行了定量分析。对中间通道的虚线标示区域(见图 5(a))的浓度值标准化后,选取不同时间点分析其梯度变化。需要指出的是,浓度梯度的稳定状况取决于旁通道的液体流动情况,要维持稳定的梯度分布,需要控制旁通道中的液体流动使其保持稳定层流状态。在本实验中,通过控制微注射泵以  $2 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速同时施加负压驱动 2 个旁通道的溶液流动,由于微流控芯片中通道的尺寸为  $\mu\text{m}$  级,由雷诺公式可判断,溶液在通道内呈现层流特性。荧光素分子垂直于流速方向由高浓度向低浓度方向扩散,形成梯度分布,在 3 h 后逐渐达到稳定,并在连续 6 h 小时内保持相对恒定(见图 5(b))。该结果提示,微流控芯片的中间通道处可生成介于 2 个旁通道浓度之间的化学浓度梯度,从而对细胞施加不同生化因子的浓度梯度刺激以研究其反应。

**2.2.2 微流控芯片内压力梯度的表征** 施加压力梯度,能够在中间通道的多孔介质中产生间隙渗流,从而对三维状态下细胞施加剪切力刺激。间隙渗流在研究中通常涉及 3 个尺度,包括孔隙尺度、表征体元尺度和宏观尺度,基于不同尺度有多种不同的计算方法与数学模型<sup>[13]</sup>。本实验考察宏观尺度下多孔网络中的渗流情况,该方法不是直接求解微孔内的流动,而是根据压力梯度与间隙渗流之间的正比关系,由视在压力梯度去表征多孔网络结构中的渗流情况。

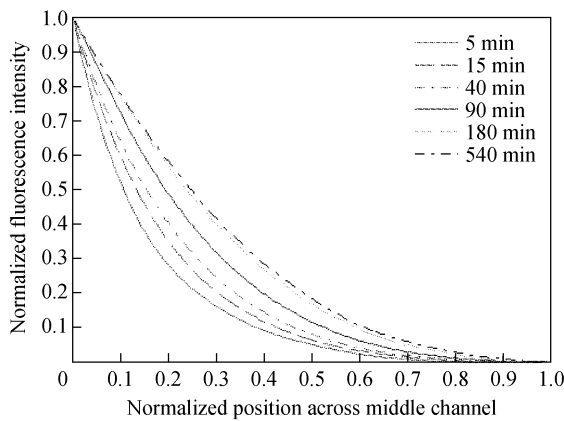
视在压力梯度的计算方法为

$$\nabla p = \frac{p_2 - p_1}{L}$$

其中: $p_1$  和  $p_2$  分别为两边通道内的压强, $L$  为中间通道的宽度, $p_2 - p_1$  为 100 Pa, $L$  为 900  $\mu\text{m}$ ,带入公式求得  $\nabla p$  为 0.11 Pa/ $\mu\text{m}$ 。压力梯度的稳定性取决于两侧储液池液面的高度差能否维持恒定。由于 PDMS 具有良好的透气性,通道内水分容易挥发,本实验将芯片置于高湿度的孵箱内,并用液态石蜡封闭储液池液面,从而避免液体的快速挥发,以维持相



(a)



(b)

图5 微流控芯片内荧光素浓度梯度的表征 (a) 荧光图片(虚线区域为分析区域), (b) 荧光强度数值分析

Fig.5 Demonstration of concentration gradient across the middle channel (a) Fluorescent images(dashed line indicates the location of fluorescent measurement), (b) Plot of the fluorescent intensity profile

对稳定的高度差。此外,在实验中由于发生了液体流动,液面的高度差会逐渐变小,从而导致压力梯度的值变小。然而由于在微通道中间隙渗流的速度很小,这个变化比较缓慢,通过测量发现平均每6 h高度差减小约10% (1 mm)。实验通过每6 h调整1次液面高度差,使压力梯度能够维持在原来的水平。

### 2.3 微流控芯片内细胞三维的培养

**2.3.1 细胞在胶原水凝胶三维支架结构中的培养**  
 水凝胶材质均匀,可包埋细胞,更重要的是其与体内胞外基质物理性质十分相似,有利于细胞伸展、迁移以及活性表达,因此是细胞三维培养中十分理想材料。对I型胶原水凝胶进行扫描电镜观察,发现其聚合后,形成的生物多孔网络结构(见图6),该结构具有较好的液体输运性质,有利于生化因子的交换与间隙渗流的生成。在微流控芯片中对细胞进行三维培养24 h后细胞形态如图7所示。

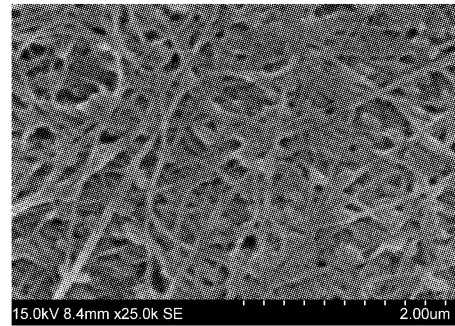


图6 胶原水凝胶的扫描电镜图

Fig.6 SEM photograph of the collagen gel

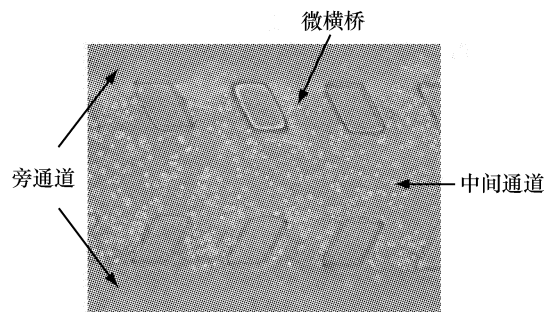


图7 通道内细胞的三维培养

Fig.7 3D cell culture across the channel

### 2.3.1 二维和三维培养条件下的细胞形态学比较

对在通道中的水凝胶支架进行三维培养的细胞与常规二维培养的细胞的骨架染色结果比较发现,二维培养条件下贴壁生长的细胞骨架为平面线条排布,而三维培养的细胞骨架呈由中心向四周发散的射线状(见图8)。在真实的生理条件下,细胞通过紧密连接或缝隙连接等连接方式建立细胞间及细胞与胞外基质间的联系,形成一定的三维空间结构,细胞三维培养可为细胞提供类似体内生长环境的支架或基质,而与体内细胞生长情况更为相似;此外,利用微流控芯片实现三维细胞培养,既能保留体内细胞三维生长的物质结构基础,又能体现细胞培养的直观性及条件可控制性,把细胞培养及其对微环境中不同参数应激响应的研究联系起来。

## 3 结论

细胞的形态结构与功能,细胞的生长、增殖、分化和基因、蛋白的表达,都与细胞所处的微环境密切相关。以往常规的研究手段不能精确地调控细胞微环境中的一些关键因素,也难以实现持续性的同步观察。然而在如血管生长、肿瘤迁移等生理现

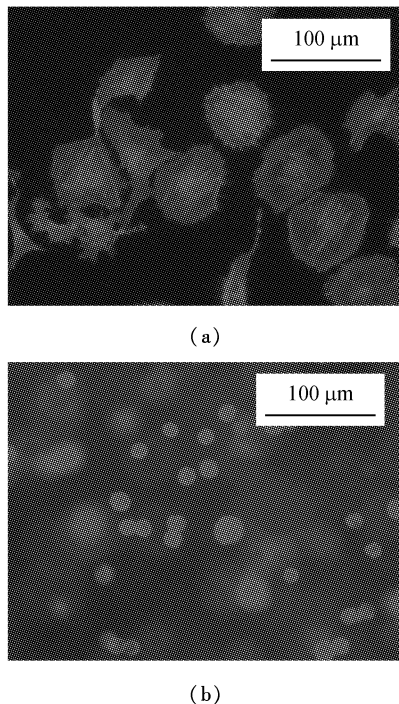


图8 细胞骨架染色 (a)二维培养,(b)三维培养  
Fig.8 The cytoskeleton staining (a) 2D culture,(b) 3D culture

象的研究中<sup>[4,14]</sup>,实现这些功能却是极为重要的。基于微流控技术的细胞体外培养模型为研究复杂却又极为重要的体内生命现象提供了重要的手段和平台。将微流控片用于细胞研究,有如下的优点:(1)微尺寸通道、多维网络结构和相对封闭的环境,接近体内的生理状态,可最大限度地模拟体内细胞真实的生理环境;(2)可精确在时间和空间上对细胞施加定量的生化或者力学刺激;(3)可以实时监控细胞的响应;(4)多块芯片可做平行试验,且试剂和样品用量少,有利于降低研究成本;(5)芯片加工周期短,可反复使用,非常适合于实验室研究。

本研究利用微流控芯片技术构建了一个细胞体外三维培养模型,探讨了微流控芯片的制作工艺,并研究了芯片中生成的生化因子浓度梯度和压力梯度的情况,对三维培养与二维培养下的细胞形态进行比较。结果表明利用该微流控芯片实现多参数调控细胞微环境是可行的。然而,细胞的微环境是十分复杂的,如何针对不同细胞生物学问题,恰当地提炼和量化微流控芯片的参数变量,从而进一步全面深入地研究微环境的各个参数对细胞行为的调控作用,仍需在今后进一步研究中加以改进和完善。

#### 参考文献:

- [1] Warrick JW, Murphy WL, Beebe DJ. Screening the cellular microenvironment; A role for microfluidics [J]. IEEE Rev Biomed Eng, 2008, 16(1): 75-93.
- [2] Yi CQ, Li CW, Ji SL, Yang MS. Microfluidics technology for manipulation and analysis of biological cells [J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 560(1-2): 1-23.
- [3] Weibel DB, Garstecki PG, Whitesides G M. Combining microscience and neurobiology [J]. Curr Opin Neurobiol, 2005, 15(5): 560-567.
- [4] Vickerman V, Blundo J, Chung S, *et al.* Design, fabrication and implementation of a novel multi-parameter control microfluidic platform for three-dimensional cell culture and real-time imaging [J]. Lab Chip, 2008, 8(9): 1468-1477.
- [5] Chung S, Sudo R, Mack PJ, *et al.* Cell migration into scaffolds under co-culture conditions in a microfluidic platform [J]. Lab Chip, 2009, 9(2): 269-275.
- [6] Chung BG, Flanagan LA, Rhee SW. Human neural stem cell growth and differentiation in a gradient-generating microfluidic device [J]. Lab on a Chip, 2005, 5(4): 401-406.
- [7] Sundararaghavan HG, Monteiro GA, Firestein BL, *et al.* Neurite growth in 3D collagen gels with gradients of mechanical properties [J]. Biotechnol Bioeng, 2009, 102(2): 632-643.
- [8] Wong K, Ayuso-sacido A, Ahyow P, *et al.* Assessing neural stem cell motility using an agarose gel-based microfluidic device [J]. J Vis Exp, 2008, 12: 674.
- [9] Mosadegh B, Saadi W, Wang SJ, *et al.* Epidermal growth factor promotes breast cancer cell chemotaxis in CXCL12 gradients [J]. Biotechnol Bioeng, 2008, 100(6): 1205-1213.
- [10] 李良,陈槐卿. 细胞核结构与力学生物学[J]. 医用生物力学, 2009, 24(1): 1-5.  
LI L, Chen HQ. Nuclear structure and mechanobiology [J]. J Med Biomech, 2009, 4(1): 1-5.
- [11] Toh YC, Zhang C, Zhang J, *et al.* A novel 3D mammalian cell perfusion-culture system in microfluidic channels [J]. Lab Chip, 2007, 7(3): 302-309.
- [12] Cheng SY, Heilman S, Wasserman M, *et al.* A hydrogel-based microfluidic device for the studies of directed cell migration [J]. Lab Chip, 2007, 7(6): 763-769.
- [13] 郭照应,郑楚光. 格子 Boltzmann 方法的原理及应用[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 201-209.
- [14] Mosadegh B, Saadi W, Wang SJ, *et al.* Epidermal growth factor promotes breast cancer cell chemotaxis in CXCL12 gradients [J]. Biotechnol Bioeng, 2008, 100(6): 1205-1213.