

基于微流控芯片技术的三维细胞培养模式的建立及研究

许志贇 李恩成 张黎川 应力 王琪

基金项目:国家自然科学基金项目(30670532,81071228)

作者单位:116044 辽宁省,大连医科大学(许志贇 李恩成 张黎川 应力)

116027 辽宁省,大连医科大学附属二院呼吸内科(王琪)

通讯作者:王琪, E-mail: wqdmu@yahoo.com.cn

【摘要】 目的 建立适于进行三维联合细胞培养的微流控芯片平台。方法 设计与制作一个多通道连接的高通量微流控芯片平台,通过向微通道内灌注含有细胞悬液胶质的方法构建三维立体培养体系,并通过注射泵连续供给细胞营养物质以模拟体内细胞生存的微环境,将肺癌细胞与人肺成纤维细胞置于体系中进行近似于人体生理条件下的三维联合细胞培养。结果 成功建立了适于进行三维联合细胞培养的微流控芯片平台,实现了肺癌细胞与人肺成纤维细胞的联合三维培养。三维培养状态下的细胞生长状态良好,人肺癌细胞围绕肺成纤维细胞成串状生长,与二维单层培养模式的伸展状态明显不同。结论 以基于微流控芯片技术的三维细胞培养模式为模型进行肿瘤生物学方面的研究,能够比较真实的反映肿瘤细胞的生物学特征,为微流控芯片技术在医学和生物学研究方面提供了一个新思路。

【关键词】 细胞培养;微流控芯片;肺癌;人肺成纤维细胞

Fabrication and application of a 3D co-culture device based on microfluidic chip

XU Zhi-yun, LI En-cheng, ZHANG Li-chuan, et al. Dalian Medical University, Dalian 116044, China

【Abstract】 Objective To fabricate a 3D co-culture device based on microfluidic chip. **Methods** A high throughput microfluidic device with multi-channel connection was designed and constructed. A 3D co-culture system was fabricated by means of injecting cell suspension colloidal substance to microchannels and the tumor microenvironment in vivo was stimulated by providing nutrients continuously by injection pump. Lung cancer cells and human pulmonary fibroblast cells were co-cultured similarly to the human physiological conditions in this system. **Results** A 3D co-culture device based on microfluidic chip was fabricated. The co-culture for lung cancer cells and human pulmonary fibroblast cells were accomplished. All cells in the 3D co-culture system shown a good condition and lung cancer cells were clustered in the surrounding of human pulmonary fibroblast cells. It was significantly different from spreading cells in 2D culture system. **Conclusion** Take the 3D co-culture system based on the microfluidic chip as a model can offer help for cancer biology research to truly reflect the biological characteristics of tumor cell. Microfluidic chip technology will provide a new idea in medical and biological research.

【Key words】 Cell culture; Microfluidic chip; Lung cancer; Human lung fibroblast cells

细胞培养是肿瘤体外研究中最核心、最基础的技术。目前,对肿瘤细胞的体外培养多采用二维单层细胞培养模式。这种模式下的癌细胞呈均一性,肿瘤与其生长的微环境间的依存作用不强;而体内生长的实体瘤是一个三维的特殊的细胞群体,细胞异质性明显,细胞-细胞、细胞-微环境之间存在着广泛的相互作用和相互影响,与二维单层培养模式存在明显差异。因而,二维单层细胞培养模型不能很好地

模拟体内实体瘤的生长特性,其生长速率、形态、胞内代谢活动等都会发生改变。可见,三维细胞培养模式能较好地模拟实体瘤的微环境,也能够较为完整地体现细胞的生物学特征,是模拟肿瘤体内生存状态进行相关研究的理想模式。但目前常规采用的培养瓶、培养皿等平板平台在进行三维细胞培养过程中存在一定的困难,技术上需要进一步改进。

微流控芯片又称芯片实验室,指的是把生物和

化学等领域中所涉及的样品制备、反应、分离、检测等基本操作单元集成或基本集成到一块几平方厘米(甚至更小)的芯片上,由微通道形成网络,以可控流体贯穿整个系统,用以取代常规生物或化学实验室的一种多功能的技术^[1,2],具有高通量、集成化、试剂消耗量少等特性。由于微流控芯片通道中液体通过的尺寸与细胞生长所需的空间相匹配,特别适合细胞培养,因此,该平台已成为新一代细胞研究极其重要的技术。

本研究拟以微流控芯片为平台、以肺癌细胞和人肺成纤维细胞为研究对象,采用联合三维细胞培养模式,连续供给营养物质,使培养条件更贴近于人体的内环境,以便更真实的反应体内实体肿瘤的情况,以期在肿瘤生物学研究方面起到推动作用。

1 材料与方

1.1 细胞株 人肺腺癌细胞株 SPCA-1,由大连医科大学组胚教研室提供(购自中国医学科学院细胞中心)。人肺成纤维细胞 HFL1,购自中国科学院细胞库。

1.2 主要试剂及仪器 RPMI 1640 培养基(GIBCO 公司);优质胎牛血清(PAA);基底膜提取物(basement membrane extract, BME)(R&D Systems 公司);Sylgard 184 硅橡胶弹性体和 Sylgard 184 固化剂(美国 Dow Corning 公司);细胞培养孵箱(美国 Forma Scientific 公司);倒置显微镜(奥林巴斯公司);真空干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司);高压灭菌蒸锅(上海医用核子仪器厂)等。

1.3 方法

1.3.1 微流控芯片的设计与制作 依据体内细胞与细胞、细胞与培养介质间相互作用的特性、流体力学原理以及联合三维细胞培养的需要,设计一个适于

进行联合三维细胞培养的多通道连接的高通量微流控芯片,包括:进液池、连接弯曲通道(防止液体逆流)、细胞培养单元、废液池。细胞培养单元包含细胞加样池、两个平行细胞培养池、细胞废液池。每个通道和培养池的大小和直径要一致以保证通道及培养池内的细胞流体力学特性均一。微流控芯片各通道及进样池长、宽、高及孔径等设计尺寸如图 1 所示,细胞培养池内三维细胞培养单元如图 2 所示。细胞培养池中间的浅黄色部分充满含有细胞的胶质,细胞可以在其中联合三维培养;两侧红褐色通道中充满培养基,培养基通过灌胶缓冲区扩散到细胞培养池中达到饱和和对细胞进行作用。其中,灌胶缓冲区的作用是防止灌入细胞悬胶时堵塞流体通道。将 FreeHand 绘制的芯片构造图打印在透明胶片上作为掩模,采用标准光刻工艺制作模具。采用浇筑法,将 Sylgard 184 硅橡胶弹性体和 Sylgard 184 固化剂以 10:1 的比例混合,搅拌均匀,在真空干燥箱中抽气,倾倒在模具表面,80℃烘烤 1 h 后取出,待冷却后将固化的 PDMS 剥离;在基片上相应位置钻出进样孔、废液孔、细胞入孔、细胞出孔,然后切割成合适的大小。最后用等离子体活化 PDMS 基片表面并将之不可逆地键合到载玻片上,制得完整的用于细胞三维培养的微流控芯片^[3]。

1.3.2 芯片处理 在用于细胞培养前,芯片首先要经过 121℃ 高压灭菌 20 min,紫外线照射 30 min。

1.3.3 微流控芯片平台上的三维动态联合细胞培养 当细胞培养瓶中的肺癌细胞 SPCA-1 与人肺成纤维细胞 HFL1 处于对数生长期时,分别用 0.25% 胰酶消化,充分吹打,以离心半径 10 cm,1000 r/min 离心 5 min,1640 培养液配置成 2×10^5 /mL 的单细胞悬液。将两种细胞悬液按 1:1 比例混合,再吸取少量混合

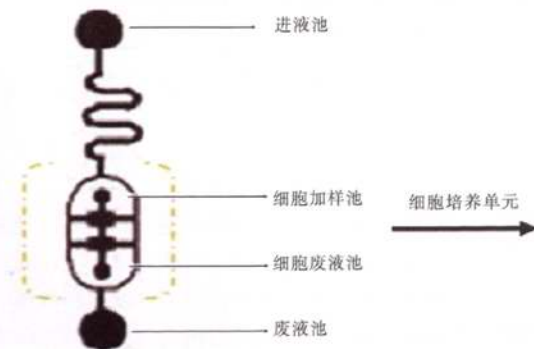


图 1 微流控芯片结构示意图

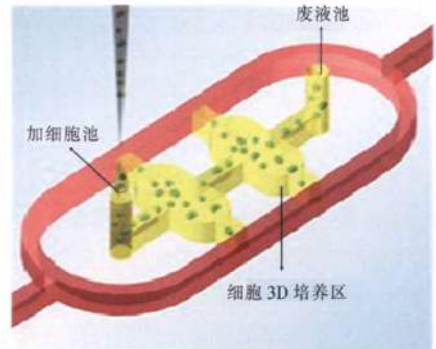


图 2 三维细胞培养单元示意图

注:进液池直径:1.5 mm;废液池直径:1.5 mm;细胞加样池直径:0.6 mm;细胞废液池直径:0.6 mm;细胞培养池容积:0.7 mm×0.4 mm×0.1 mm;普通通道宽度:0.2 mm;灌胶缓冲区宽度:0.2 mm;细胞培养池外周椭圆宽度:0.1 mm;通道深度:0.1 mm

细胞悬液与等体积基底膜提取物 BME 混合,缓慢通过细胞加样孔注入细胞培养池。将芯片放入无菌的装有少许 PBS 的培养皿中,30 min 后,待含有细胞的胶质凝固,利用注射泵从进液孔加入新鲜 1640 培养液,将流量及流速调整为 15 mm/24 h,以进行模拟体内细胞生存的微环境条件下的细胞培养,如图 3 所示。将其置于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱内进行联合三维细胞培养,分别于 24 h、72 h 后观察细胞生长状态。

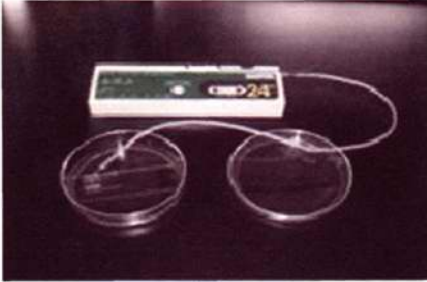


图 3 微流控芯片连接注射泵模拟体内微环境

2 结果

通过倒置显微镜观察:二维培养模式下人肺腺癌细胞 SPCA-1 贴壁呈不规则状(图 4a),人肺成纤维细胞 HFL1 贴壁呈长梭形(图 4b)。三维联合细胞培养模式下 24 h 观察细胞生长状态良好,细胞间连接紧密,人肺腺癌细胞 SPCA-1 呈球体生长,人肺成纤维细胞 HFL1 结成网状(图 5a),72 h 后观察人肺腺癌细胞 SPCA-1 围绕在人肺成纤维细胞 HFL1 周围成串状生长(图 5b)。可见三维联合培养模式下细胞形态与二维单层培养模式的伸展状态明显不同。本实验成功完成了在微流控芯片上的人肺腺癌细胞和人肺成纤维细胞的三维立体培养。

3 讨论

微流控芯片是本世纪一项重要的科学技术,也是目前已被公认的系统生物学研究的主要技术平台之一。因为芯片的多维网络结构可以形成相对封闭的环境,与生理状态下细胞的空间特征接近,在三维细胞培养方面具有独特的优势同时,还可以连续供应营养物质,能够较好地模拟体内细胞生存的微环境。经过二十年来的不断发展,微流控芯片已经成为新一代细胞研究极其重要的平台。

本文研究成功地利用微流控芯片平台将肺癌细胞与人肺成纤维细胞联合三维培养,引进了间质细胞,较单纯地研究癌细胞,此联合三维培养模式更接近体内实体瘤的状态,加上动态的供给营养物质,更好地模拟体内肿瘤微环境,在肿瘤生物学方面的研

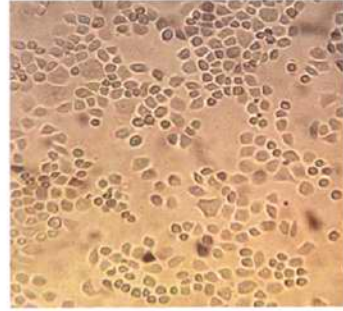


图 4a 二维培养人肺腺癌细胞 SPCA-1 细胞形态($\times 10$)

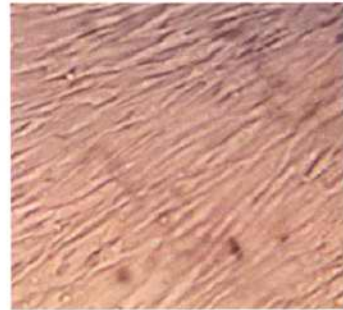


图 4b 二维培养人肺成纤维细胞 HFL1 细胞形态($\times 10$)

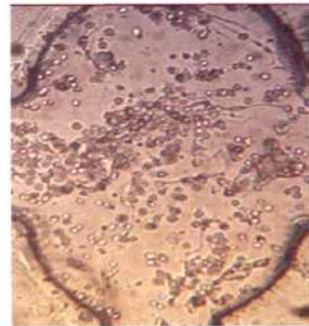


图 5a 三维联合细胞培养 24 h 细胞形态($\times 10$)

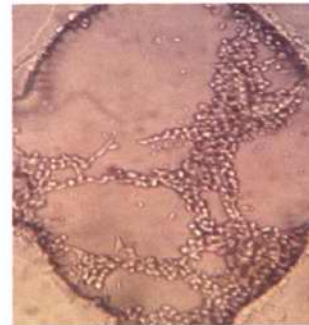


图 5b 三维联合细胞培养 72 h 细胞形态($\times 10$)

究中有着独特的优势。

很多研究^[4,5]证明,以二维单层细胞为模型得到的化疗敏感性结果与体内实验差距较大,而以三维培养为模型进行的体外研究,肿瘤细胞在细胞形态

学、细胞周期、细胞凋亡等方面与实体瘤体内的情况更加接近,对 5-氟尿嘧啶等化疗药物的耐药性明显提高^[6,7],且其耐药性与体内实体瘤相似^[8]。可见,三维细胞培养模式已经为越来越多的学者所认同。

近年来,国内外很多学者利用微流控芯片技术在细胞领域进行了大量的研究,涉及到细胞培养、细胞分选、裂解、内含物测定等,并应用于蛋白检测、核酸分析以及药物筛选等领域^[9-12]。利用 T 字形芯片成功进行了肺癌细胞培养和免疫荧光细胞化学反应检测^[9];利用微泵、微阀的支持控制样品的流向,有效地进行了氨基酸的分离^[10];同时还通过构建微流控梯度芯片实现了化疗药物的浓度梯度分离和不同药物浓度梯度下细胞活性的分析^[11];通过浓度梯度发生器装置, Ye 等^[12]完成了不同浓度阿霉素诱导肝癌细胞凋亡的研究。这些研究在很大程度上体现了微流控芯片技术所具有的标本消耗少、反应速度快以及高通量、集成化等优势。而且,由于可以模拟体内微环境,这一技术在细胞以及肿瘤研究领域显示了强劲的发展势头。模拟细胞生长的微环境,采用三维细胞培养及连续动态供应营养的新模式势必成为肿瘤生物学研究的一个新方向。

鉴于微流控芯片技术的规模化集成、高通量检测的优势,通过多种单元技术的灵活组合,在微流控芯片平台上同时进行多种细胞的联合培养以及多种因子的高通量筛选。在接近体内生理条件的三维联合细胞培养模式下,通过进行药敏检测、蛋白检测、细胞凋亡检测等更准确、更高效地研究肿瘤的发生发展以及化疗耐药等方面的机制,同时也将开拓该技术在医学和生物学领域的应用前景。

4 参考文献

1 方肇伦.微流控分析芯片发展与展望.大学化学,2001,16:1-6.

2 Manz A, Graber N, Widmer HM, et al. Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing. *Sens Actuators B Chem*, 1990, 1: 244-248.

3 李雷, 张雅鸥, 叶大田. 在 PDMS-玻璃微流控芯片上的细胞培养. *清华大学学报(自然科学版)*, 2010, 50: 458-461.

4 Teicher BA, Herman TS, Holden SA, et al. Tumor resistance to alkylating agents conferred by mechanisms operative only in vivo. *Science*, 1990, 247: 1457-1461.

5 Ng CP, Bonavida B. A new challenge for successful immunotherapy by tumors that are resistant to apoptosis: two complementary signals to overcome cross-resistance. *Adv Cancer Res*, 2002, 85: 145-174.

6 Kunz-Schughart LA, Kreutz M, Knuechel R. Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology. *Int J Exp Path*, 1998, 79: 1-23.

7 李建军, 蒋勇, 胡绍毅, 等. 三维或单层培养结肠癌 HTO29 细胞药物敏感性及生物学特性的变化. *第三军医大学学报*, 2005, 27: 1760-1762.

8 Kobayashi H, Man S, Graham CH, et al. Acquired multicellular-mediated resistance to alkylating agents in cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 3294-3298.

9 Chan SD, Luedke G, Valer M, et al. Cytometric analysis of protein expression and apoptosis in human primary cells with a novel microfluidic chip-based system. *Cytometry A*, 2003, 55: 119-125.

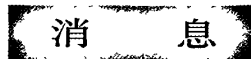
10 Ma B, Zhang G, Qin J, et al. Characterization of drug metabolites and cytotoxicity assay simultaneously using an integrated microfluidic device. *Lab Chip*, 2009, 9: 232-238.

11 Komen J, Wolbers F, Franke HR, et al. Viability analysis and apoptosis induction of breast cancer cells in a microfluidic device: effect of cytostatic drugs. *Biomed Microdevices*, 2008, 10: 727-737.

12 Ye N, Qin J, Shi W, et al. Cell-based high content screening using an integrated microfluidic device. *Lab Chip*, 2007, 7: 696-704.

(收稿日期: 2011-03-12)

(本文编辑: 张志成)



《实用检验医师杂志》开通网上采编系统

为了更好地服务于读者、作者及审稿专家,方便查询论文信息、投稿、询稿及审稿,提高编辑部工作效率,现已开通网上采编系统(www.cjocp.com)。欢迎作者网上投稿,优秀的文章将优先处理并且免收版面费。如果您在使用采编系统时有任何问题或者对开发编辑平台有更好的建议,欢迎您联系我们,我们将热情为您服务。感谢您对编辑部工作的支持!

联系人: 张志成; 联系电话: 15900366486, 022-60577729; E-mail: jianyanyishi@163.com