

微流控芯片在细胞分析中的应用

杨秀娟 李 想 童艳丽 李偶连 刘 翠 陈缙光*

(中山大学药学院, 广州 510006)

摘要 细胞是生物体和生命活动的基本单位, 细胞分析对于细胞结构和功能的研究、生命活动规律和本质的探索、疾病的诊断与治疗、药物的筛选与设计等都具有十分重要的意义。自微流控芯片面世以来, 以其微型化、集成化、自动化和便携化等优势越来越多地应用在细胞分析领域。现就微流控芯片在细胞操纵、细胞培养和细胞内组分分析三个方面上的应用进行综述。

关键词 微流控芯片; 细胞操纵; 细胞培养; 细胞内组分分析

微流控芯片(microfluidic chip), 又称微全分析系统(micro total analysis system, μ -TAS)或者芯片实验室(lab-on-a-chip), 是指把化学和生物等领域中所涉及的样品制备、反应、分离、检测及细胞培养、分选、裂解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, 用以取代常规化学或生物实验室的各种功能的一种技术平台^[1]。微流控芯片具有分离效率高、分析速度快、分离模式多、所需样品少、应用范围广、自动化程度高等优点, 充分体现了当今分析设备微型化、集成化、自动化和便携化的发展趋势, 被广泛应用于生命科学、疾病诊断与治疗、药物合成与筛选、农作物育种与改良、环境监测与控制 and 战时对病原体检测等领域。

细胞是生物体和生命活动的基本单位, 细胞的研究对人类发展有着重大的意义。随着对细胞研究的不断深入, 从细胞群、细胞整体、亚细胞结构深入到分子结构; 从细胞内各组分分析深入到对细胞呼吸作用、光合作用、信息传递、跨膜运输等生命活动的研究, 传统的细胞分析仪器已不能满足对细胞研究的需求; 而新型的细胞分析仪器、分析技术不断涌现, 其中, 微流控芯片以其独有的优势在细胞分析中起着越来越重要的作用。自 1997 年 Li 等^[2]首次微流控芯片上实现单细胞的操纵、反应以来, 许多分析工作者致力于这一领域的研究: 国外如 Manz、Lee、Berg、Toner 等研究小组, 国内如方肇伦、林炳承、程京、程介克、罗国安等研究小组。近些年来, 这些研究小组也出版了相关的专著^[3]与发表了一些综述性文献^[4-6]及大量的研究报道。

微流控芯片用于细胞分析, 有如下的优点:

(1)微通道的尺寸与细胞尺寸相当, 在微流控芯

片上对细胞的研究可深入到单细胞甚至亚细胞器水平。

(2)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, 可实现无损或者微损检测。

(3)平板式几何构型, 更容易进行观察、检测; 而且传热、传质迅速, 提高分析的精确度和灵敏度。

(4)可以将诸多细胞研究操作步骤集成在同一块芯片上, 有利于平行操作和连续分析。

(5)可以满足高通量细胞分析的需要, 同时获取大量的生物学信息。

(6)芯片设计灵活多样, 可与相关分析仪器集成或联用。

(7)节省时间、样品和试剂, 有利于降低研究成本。

1 细胞操纵

微流控芯片细胞操纵是将细胞运送到预定的位点, 将其固定后, 进行细胞成分、结构和功能等分析^[3]。通常地, 这还包括了对目标细胞的分离和筛选。在微流控芯片上运送和固定生物细胞, 要求操作简便、高效, 同时能保持细胞活性。目前在微流控芯片上进行细胞操纵的方法主要有: 机械操纵法、光学操纵法、电场操纵法和磁力操纵法等。Chen 等^[7]对各种细胞操纵分选技术进行了详细的报道。

1.1 机械操纵法

收稿日期: 2008-06-24 接受日期: 2008-08-21

国家自然科学基金资助项目(No.20375049, No.20575080, No.20727006)

* 联系人。Tel/Fax: 020-39943044, E-mail: chenzg@mail.sysu.edu.cn

机械操纵法主要是指利用微机械加工技术,在芯片上刻蚀出各种结构,如微筛、微阱、微沟、梳状、堰状、沙袋等,根据细胞尺寸的差异进行物理分离的一种方法。它具有工作原理简单,不需要特殊的缓冲液等优点。缺点是制作微结构较复杂,而且要求目标细胞和杂质细胞必须有明显的尺寸差异。

Lee 研究小组在微流控芯片细胞机械操纵方面做了大量的研究工作。如他们设计了一种含有 U 型截留结构阵列的微流控装置^[8],每个 U 型截留单元无需表面修饰,可在 30 s 内截留并固定单细胞,进而可进行细胞培养和细胞分析。陈兴等^[9]制备了一种错流过滤式细胞分离微流控芯片,有效地避免了芯片堵塞问题;且采用坝式分离结构,提高了血细胞中白细胞和红细胞的分离效率。孙悦等^[10]采用传统光刻技术和三步刻蚀法制作了一多深度通道的微流控芯片(图 1),在分离通道中设置了围堰,保证了单细胞在分离通道中的准确定位和静态溶膜,电泳分离后进行激光诱导荧光检测(LIF),分析了人类单个肿瘤细胞中的谷胱苷肽和活性氧。

1.2 光学操纵法

光学操纵的基本原理是:当光束照射到细胞时,对细胞产生作用力,细胞被捕获在光束的焦点附近;或者在这个力的作用下,细胞被运送到目标检测分析位

置。光学操纵法的优点是不接触、不损伤细胞,污染少,便于微尺寸范围的精细操作,可达微米级的精确定位;缺点是设备昂贵,仅适于细胞短距离操纵。光学操纵常用的是光镊技术(optical tweezers or optical traps),其可对细胞进行精确的定位。

Ramser 等^[11]用一集成了拉曼光谱、激光光镊的微流控芯片的装置,对单个红细胞进行操控和光谱收集,从拉曼光谱特征峰位置、强度和线宽可实时监测细胞中的氧循环和光诱导作用对细胞内物质相互作用的影响,也可以进行细胞内药物效应的实时检测。光镊技术可用于荧光激发细胞分选(fluorescence activated cell sorter, FACS)。FACS 是指对细胞进行荧光标记,以激光激发出的荧光信号的有无或强弱控制细胞的流向。Wang 等^[12]设计的一种微流控装置,可精确控制细胞位移而达到细胞分选的目的。细胞在激光束的照射下,通过绿色荧光蛋白表达发出荧光的细胞在光镊作用下流向收集池,而非绿色荧光蛋白表达的细胞因未受光镊作用而流向废液池(图 2)。为满足微流控芯片体积小、高通量和低成本的需要,在光学操纵中还使用了垂直腔面发射激光器(vertical cavity surface emitting lasers)及其阵列。Shao 等^[13]研制了一显微集成的 VCSELs 阵列截留系统装置,能够独立控制和批量处理生物细胞,便于进行平行操作。

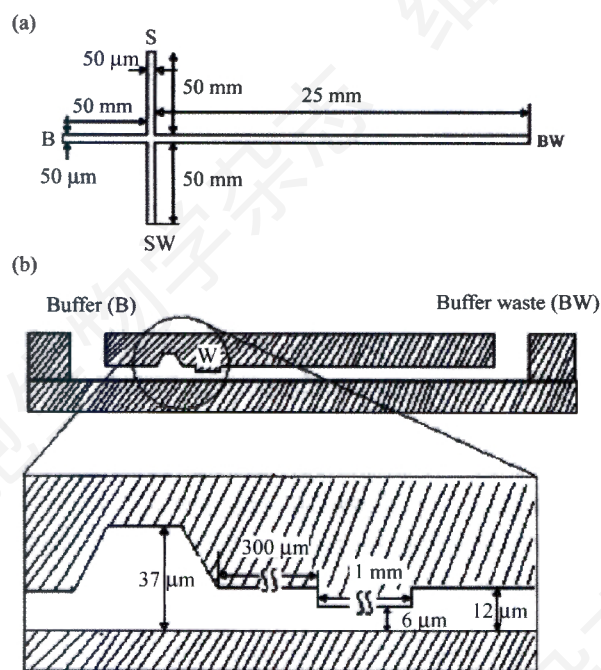


图 1 微流控芯片多深通道设计示意图^[10]

a: 芯片的光掩模图; b: 芯片结构略图; 进样通道深 37 μm , 分离通道围堰 W 处深 6 μm , 其他部分深 12 μm 。

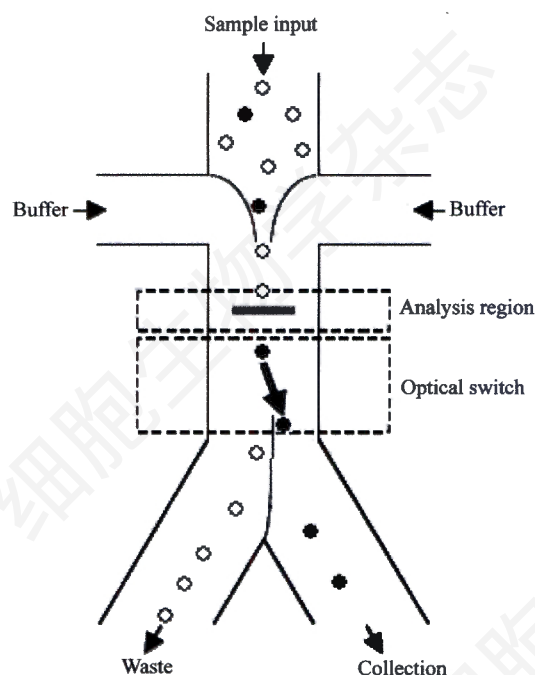


图 2 光镊细胞操纵实验流程图^[12]

通过绿色荧光蛋白表达发出荧光的细胞在光镊作用下流向收集池,非绿色荧光蛋白表达的细胞因未受光镊作用而流向废液池。

1.3 电场操纵法

电场操纵法常用介电电泳技术(dielectrophoresis, DEP), 是指细胞在不均一交变的电场中被诱导极化, 不同的细胞由于介电特性、电导率、形状或大小等不同而感应出不同的偶电极, 因此在电场中受到不同的介电力的而得以分离^[1]。常常是将众多的微电极集成在芯片上, 形成一个电场梯度, 使极化程度不同的细胞或颗粒在电场中受到不同的介电力而达到分离。该法的优点也是不接触细胞, 无污染。

Hunt 等^[14]设计了一种介电电泳镊子(图 3), 能够从三维角度去定位单个细胞, 而且可以用大于 10 pN 的力在流速为每秒数百微米的液流中固定目标细胞。最近 Hunt 等^[15]又研制出一种含集成电路的微流控芯片, 利用介电力作用可以对众多的细胞同时独立地进行移动、捕获和定位。Tai 等^[16]报道了一种利用介电力对细胞进行分离和细胞核进行收集的新型生物芯片。通过 MEMS 技术将 DEP 电极阵列、微通道、微泵和微阀都集成在一微流控芯片上, 可实现细胞自动转运、分离和收集。程京研究组^[17]研制了一种新型的自动定位和感受微电极阵列芯片, 通过使用负介电力, 同时使所需神经元自动地、无损地定位在 48 个微记录电极上, 促进了对神经元电生理活动的检测。

电旋转技术被广泛用于测定各种生物颗粒的介电特性, 其与芯片技术结合起来, 可以对细胞进行自动定位和用于细胞电生理检测。程京研究组^[18]构建

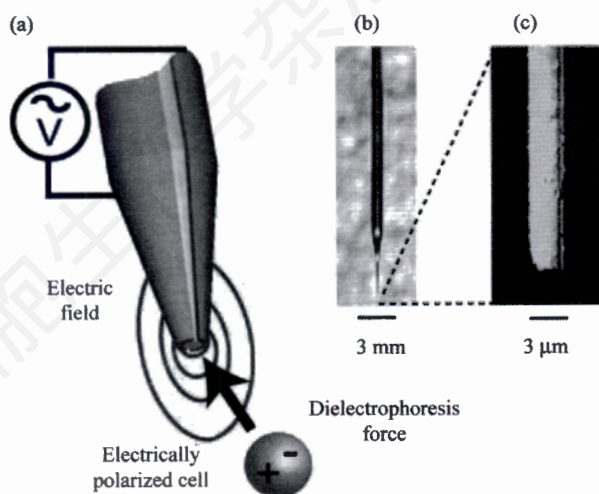


图 3 介电电泳镊子^[14]

a: 介电电泳镊子应用示意图。电压经过在玻璃尖端里两边的电极产生电场, 使细胞极化并吸附到尖端。b: 介电电泳镊子的照片。c: 镊子尖端扫描电镜图。

了一种高通量电旋转阵列芯片及盖片系统, 并用该系统对 Jurkat 细胞进行定位和测定细胞的有关介电特性。

1.4 磁力操纵法

磁力操纵常采用免疫磁珠。原理是: 特定的细胞表面抗原能与包被在磁珠上的特异性抗体结合, 在外加磁场作用下, 含有特异性抗原的细胞被吸附而滞留在磁场中, 而没有该种表面抗原的细胞则不能与抗体结合, 没有磁性, 不能在磁场中停留, 从而使不同的细胞得到分离^[1]。利用磁珠分离捕获目标细胞的方法有直接法和间接法。直接法是用目标细胞的特异性抗体直接修饰磁珠, 修饰磁珠与样品混合特异性吸附目标细胞; 间接法是使目标细胞表面特异抗原的抗体与目标细胞充分反应, 然后加入经第二抗体修饰的磁珠, 充分反应, 目标细胞吸附到磁珠上^[19]。磁力操纵细胞分选具有高度的特异性、准确性, 且分选装置和操作简单。

Furdui 等^[20]设计了一 Y 形结构芯片(图 4), 通道两侧由磁极形成磁场, 通过 T 淋巴细胞与表面带有 CD-3 抗体的蛋白 A 磁珠结合, 使 T 细胞被捕获, 其他细胞流出通道, 实现了 T 细胞与血细胞的分离。Mauk 等^[21]利用包被在磁珠的抗体与肿瘤特异性细胞表面抗原(EpCAM)相结合, 在样本中分离出肿瘤细胞, 实现了口腔肿瘤细胞的筛选和诊断。Pamme 等^[22]报道了一种应用磁场对细胞进行连续分选的微流控芯片装置。他们用这套装置实现了老鼠巨噬细胞和人

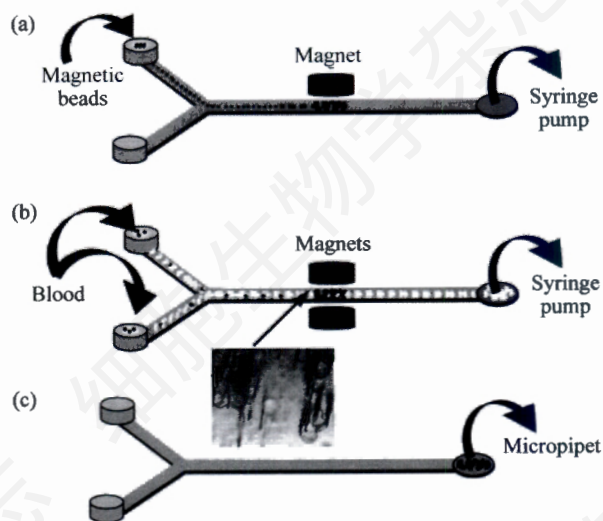


图 4 芯片免疫磁珠细胞分选工作原理^[20]

a: 标记了 CD-3 抗体的磁珠进入分离通道并固定在磁场区域; b: 把血样引入通道, T 淋巴细胞与磁珠结合被磁场捕获, 其他细胞流出通道, 实现 T 细胞与血细胞的分离; c: 除去磁场, 用微量吸移管收集 T 细胞。

类卵巢癌细胞的分离。由于不同细胞大小不同,流速不同,受到磁力作用不同,在微通道中偏转的方向不同,从而实现分离。

1.5 其他操纵方法

1.5.1 根据细胞在微循环中特有的性质 利用细胞本身的一些特性进行细胞分离。如白细胞有边集和附壁效应, Shevkoplyas等^[23]在芯片上设计了一可以加强白细胞边集效应的独特管道,在靠近管壁的地方分离得到白细胞。操作简便,不需对细胞进行前期标记。

1.5.2 体积细胞筛选 细胞是低频电流的绝缘体,当细胞在一个容量固定的腔体里发生体积变化时,会减少腔体内的溶液数量,因而改变整个腔体的电阻^[24]。根据这个原理, Ateya等^[25]设计了一种硅芯片,可以检测到1 mOsm(即2 573 Pa)渗透压引起的细胞体积的变化,导致溶液电阻的变化,实现多种细胞的同时检测和筛选。

1.5.3 库尔特计数法 库尔特技术是同样是以电阻的变化作为区分参数,用于芯片上的细胞分选。Chun等^[26]在玻璃芯片内聚合高分子化合物作为盐桥,令细胞通过盐桥,引起阻抗响应值变化,这种变化与细胞大小有关,因此可用于人红细胞和白细胞的分选。

2 细胞培养

细胞培养是指从体内组织取出细胞,模拟体内生存环境,在无菌、适当温度及酸碱度和一定营养条件下,使其生长繁殖并维持结构和功能的一种培养技术。细胞培养常采用瓶皿或微孔板。但是,细胞的体积微小,这些传统的皿板提供的培养环境明显与体内环境相差甚远,难以真实反应生理状态下细胞的生物学特征性。微流控芯片具有相对封闭的多维网络结构,通道尺寸与细胞尺寸相当,而且芯片制作材料众多、结构设计灵活多样,因而越来越多地应用于细胞培养。在微流控芯片上进行细胞培养的常用方法是灌流式培养(microfluidic perfusion culture),是指将细胞悬液注入微通道或者微培养室,待细胞贴壁后,将培养液连续灌入培养区域,实现营养物质的连续更新^[1]。以下是一些应用微流控芯片进行细胞培养的研究报道。

在细胞的自动培养和溶膜方面, Nevill等^[27]研制出一种新型芯片,集成了细胞自动培养和细胞自动溶解的功能。他们利用这种芯片对 HeLa、MCF-7、

Jurkat 和 CHO-K1 细胞培养了5天,然后利用芯片上微室自生成的氢氧化物离子对细胞进行电化学溶解,无需另加溶解试剂。Gómez-Sjöberg等^[28]在芯片上建造了一个全自动细胞培养筛选系统。可在芯片上96个独立培养室进行细胞培养,细胞活性可维持数星期。

在细胞共培养方面,林炳承课题组借鉴通透性水凝胶材料的微加工技术,研制了一系列具有不同功能的水凝胶立体微结构,用于细胞培养。还可应用这种技术制备微孔阵列,实现对不同种细胞的共培养。Wei等^[29]报道了一种新型的微流控共培养装置系统,可用于探讨不同种类型细胞共培养时之间相互作用的机制。最近 Leclerc等^[30]设计了一种新型芯片,实现了老鼠成纤维细胞(Swiss 3T3)和肝癌细胞系(HepG2/C3a)的溶膜与共培养。

在细胞培养环境方面,细胞常处于一个非常特别的三维环境中。除了受到相邻的细胞影响外,细胞外基质是重要考察因素,它影响细胞的生长、黏附、分化、形态和信号转导。基质的成分和比例可以调整,用以影响细胞的各种行为和更好地模仿细胞外的微环境。Toh等^[31]开发了一种含有微柱阵列的微流控芯片装置,可对细胞进行灌流式培养,并为其提供了一个三维的细胞-细胞和细胞-基质相互作用的微环境。

温度对细胞培养也有一定的影响。Pennell等^[32]设计了一种可进行温度调控的芯片(图5),芯片中溶液温度范围是20~80℃,加热速率是0.5℃/ms。他们用这种芯片对温度敏感离子通道转染的HEK293细胞进行了膜片钳分析。该芯片适用于需温控的细胞培养、生物测定和化学反应。

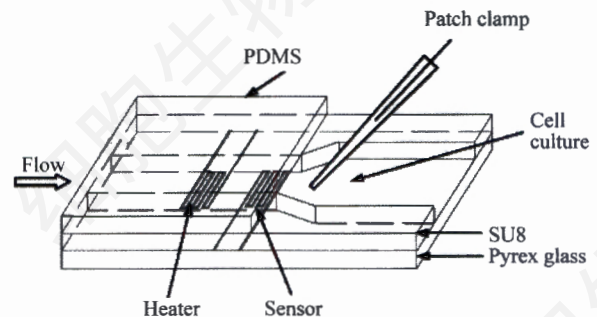


图5 温度调控芯片结构示意图^[32]

铂薄膜加热器和铂薄膜电阻式传感器顺着液流通道放置,由加热器产生的热量被液流带到检测区域,细胞培养区域的温度变化由电阻式传感器监测。

3 单细胞内组分分析

细胞内组分复杂,对细胞内成分的分析 and 测定、细胞成分间的相互作用的研究,有助于研究者了解体内细胞的代谢过程、细胞内信号转导和细胞的功能,对疾病的治疗和药物筛选等具有重大的意义。微流控芯片技术的出现为细胞内组分分析提供了一个很好的技术平台。

3.1 荧光检测

Zare 研究组^[33]设计了一种具有多层聚二甲基硅氧烷(PDMS)结构的微流控芯片,该芯片集成了细胞操纵、试剂引入及运输、细胞裂解、胞内氨基酸荧光标记、电泳分离及 LIF 检测等多种功能,实现了对单个 T 淋巴瘤细胞内 6 种氨基酸的检测。最近,他们又在微流控芯片上操纵、溶胞、标记、电泳分离和测定了单个昆虫细胞(SF9)中的低含量蛋白质^[34]。Culbertson 等^[35]报道在微流控芯片上高通量操纵单细胞进样、快速电溶胞、电泳分离和荧光检测,并将其应用于分子细胞学的研究。

3.2 电化学检测

程介克研究组^[36]研制了一种安培检测微流控芯片系统,采用碳纤维纳米电极。他们用该装置系统成功地测定了小鼠 PC12 细胞中的多巴胺。与传统的微电极相比,其灵敏度和分辨率都大大提高了。Wang 等^[37]采用微流控装置结合电化学检测研究了测定人单个血红细胞中谷胱甘肽(GSH)的方法,细胞的进样、定位、溶膜以及细胞中谷胱甘肽的转移和检测都在配有通道端安培检测器的双 T 形芯片中完成。

4 小结与展望

本文分别对微流控芯片在细胞操纵、细胞培养和细胞内组分分析三个方面的应用进行简单的介绍和列举了一些最近的研究报道。在细胞操纵中,磁力操纵分选的方法因为仪器制作简单、操作方便、易于集成而有广阔的应用前景;在细胞培养中,芯片材料 PDMS 有一定化学惰性、可塑性强、无毒、廉价,可作为细胞培养芯片制作的首选材料;而细胞内组分的分析则对临床医药学和生命活动机制的研究有着重要意义。

尽管微流控芯片为细胞分析提供了一个很好技术平台,但仍存在不足之处,可在以下几方面进行进一步的研究:

(1)细胞与芯片界面要形成集成系统,该系统能高分辨地分析和控制细胞生理功能的变化。

(2)新的能透过细胞膜的荧光探针和新的标记物质的研究,如量子点^[38]等;以及与之相应的标记方法的研究。

(3)多维结构的适用于细胞分析的芯片制作。

(4)开发高灵敏度、易于集成在芯片上、操作简便的检测仪器。

越来越多的研究正是针对以上的不足之处而展开,如程京研究组^[39]最近报道了一种在芯片上对细胞迁移检测的新芯片阵列系统,能实时读出及解释大量集成的阵列信号,实现对细胞迁移的实时自动控制和定量监测,从而可更好观察和控制细胞生理功能的变化。量子点,也称荧光半导体纳米晶体,广泛应用于活细胞成像。它具有光稳定性、近红外发射性能、可超长时间检测、灵敏度高、不干扰细胞内信号和对细胞无毒害等优点。Pathak 等^[40]将量子点应用到神经科学,用作探测神经细胞的新手段。纳米技术材料的出现、微加工技术的发展和电化学、光学和计算机等学科的介入,为芯片的制作和微型化、集成化、高灵敏度检测器的研制提供了一个广阔的技术平台。可以展望,微流控芯片将在细胞分析领域发挥越来越重要的作用。

参考文献(References)

- [1] 林炳承等. 微流控芯片实验室, 北京: 科学出版社, 2006, 1
- [2] Li PC *et al.* *Anal Chem*, 1997, **69**: 1564
- [3] 程介克等. 单细胞分析, 北京: 科学出版社, 2005, 421
- [4] Huang WH *et al.* *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, **866**: 104
- [5] Sathuluri RR *et al.* *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2008, **109**: 285
- [6] Yi CQ *et al.* *Analyt Chim Acta*, 2006, **560**: 1
- [7] Chen P *et al.* *Front Biosci*, 2008, **13**: 2464
- [8] Di Carol D *et al.* *Lab Chip*, 2006, **6**: 1445
- [9] 陈兴等. 高等学校化学学报, 2007, **28**: 59
- [10] Sun Y *et al.* *J Chromatogr A*, 2006, **1117**: 228
- [11] Ramser K *et al.* *Lab Chip*, 2005, **5**: 431
- [12] Wang MM *et al.* *Nat Biotechnol*, 2005, **23**: 83
- [13] Shao B *et al.* *Sens Actuators B: Chem*, 2006, **113**: 866
- [14] Hunt TP *et al.* *Biomed Microdevices*, 2006, **8**: 227
- [15] Hunt TP *et al.* *Lab Chip*, 2008, **8**: 81
- [16] Tai CH *et al.* *Biomed Microdevices*, 2007, **9**: 533
- [17] Pan L *et al.* *J Neurosci Methods*, 2008, **170**: 123
- [18] 黄成军等. 分析科学学报, 2007, **23**: 233
- [19] 陈兴等. 仪表技术与传感器, 2005, **2**: 1
- [20] Furdui VI *et al.* *Lab Chip*, 2004, **4**: 614
- [21] Mauk MG *et al.* *Ann N Y Acad Sci*, 2007, **1098**: 467
- [22] Pamme N *et al.* *Lab Chip*, 2006, **6**: 974
- [23] Shevkoplyas SS *et al.* *Anal Chem*, 2005, **77**: 933
- [24] 慕轩等. 分析测试学报, 2007, **26**: 587
- [25] Ateya DA *et al.* *Anal Chem*, 2005, **77**: 1290

- [26] Chun H *et al. Anal Chem*, 2005, **77**: 2490
[27] Nevill JT *et al. Lab Chip*, 2007, **7**: 1689
[28] Gómez-Sjöberg R *et al. Anal Chem*, 2007, **79**: 8557
[29] Wei CW *et al. Biomed Microdevices*, 2006, **8**: 65
[30] Leclerc E *et al. Biomed Microdevices*, 2008, **10**: 169
[31] Toh YC *et al. Lab Chip*, 2007, **7**: 302
[32] Pennell T *et al. Anal Chem*, 2008, **80**: 2447
[33] Wu H *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 12809
[34] Huang B *et al. Science*, 2007, **315**: 81
[35] Culbertson CT *et al. Methods Mol Biol*, 2006, **339**: 203
[36] Cheng H *et al. Electrophoresis*, 2007, **28**: 1579
[37] 王文雷等. *色谱*, 2007, **25**: 799
[38] Michalet X *et al. Science*, 2005, **307**: 538
[39] Wang L *et al. Lab Chip*, 2008, **8**: 872
[40] Pathak S *et al. J Neurosci*, 2006, **26**: 1893

Application of Microfluidic Chip System in the Research of Cell Analysis

Xiu-Juan Yang, Xiang Li, Yan-Li Tong, Ou-Lian Li, Cui Liu, Zuan-Guang Chen*

(School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract Cells are fundamental unit of life and cell analysis has made significant contribution to the researches of the structure and function of cells; the discovery of the mystery of life; the diagnosis and treatment of diseases; the screening and design of new drugs. Micro total analysis systems have played an increasingly important role in cell studies because of their advantages including low reagent and power consumption, short reaction time, portability for in situ use, low cost, versatility in design, and potentials for parallel operation and for integration with other miniaturized devices. In this article, the applications of microfluidic chip systems on cell manipulation, cell culture and cell analysis are reviewed.

Key words microfluidic chip system; cell manipulation; cell culture; cell analysis

Received: June 24, 2006 Accepted: August 21, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.20375049, No.20575080, No.20727006)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-20-39943044, E-mail: chenzg@mail.sysu.edu.cn