

细胞微系统技术及其应用

邵建波^{1,2} 金庆辉^{1*} 赵建龙¹⁽¹中国科学院上海微系统与信息技术研究所, 上海 200050;²中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 细胞微系统技术研究是目前细胞生物学、微系统科学及药物筛选等学科交叉领域的一个研究热点, 其综合利用了微系统平台技术, 将细胞的培养、观测和分析在微系统平台上完成, 丰富了细胞研究方法, 为细胞研究提供了一个全新的研究平台。现对目前细胞微系统研究中几种典型的方法, 如立体微结构模型、软光刻、微流体、芯片毛细管电泳、微电极等进行综述, 并阐述其在细胞生物学、生命科学等领域相关研究中的应用。

关键词 细胞微系统; 立体微结构模型; 软光刻; 微流体; 芯片毛细管电泳

微系统技术即近几年来引起广泛关注的“芯片实验室(lab on a chip)”技术, 指基于微细加工技术在厘米见方的玻璃、聚合物等材料上加工微通道、微培养腔、微反应腔、微泵、微阀、微加热器、微传感器等微结构功能单元, 将生化实验或分子生物学实验的多个步骤集成到一个芯片中, 并集成相应的传感器件、控制器件和检测器件, 实现自动化精细分析。

目前, 越来越多的微系统技术应用于细胞研究, 丰富了细胞研究手段, 构建的细胞微系统平台可能取得在常规实验条件下不能达到的效果, 近几年来基于微系统的细胞研究取得的成绩正好验证其优势^[1]。细胞微系统除了微系统技术本身诸如分析速度快、试剂消耗少、适于高通量分析、便于集成化等优点之外, 还具有特殊的性质, 例如, 细胞的尺寸与微系统尺寸比拟, 可以提高对细胞的操控性; 微系统技术可以精确的控制微环境的成分、温度等因素, 模拟体内细胞外基质的情况, 同时增强实验的操作性等。

细胞微系统在细胞功能、药物筛选、组织工程学、细胞传感器等方面发挥越来越重要的作用, 下面将详细介绍细胞微系统中几种典型的方法及其在细胞生物学、生命科学等领域的应用情况。

1 微结构模型用于细胞的三维培养和功能分析

细胞的体外培养是细胞生物学研究的基础, 利用微加工工艺制作的三维立体细胞培养模具可以反映细胞与细胞和细胞与细胞外基质的三维关系, 提

供可靠稳定的分析平台。Toh 等^[2]制作了带有微柱结构的微通道系统进行三维细胞灌注培养, 实现了细胞与细胞、细胞与细胞外基质的三维接触和调节, 在长达一周的时间内都能很好的保持细胞的培养结构和维持细胞的特殊功能, 并且便于光学观察, 可以与微泵、微阀等微控制结构集成, 为细胞研究提供更多可控的参数设置。Powers 等^[3]通过对硅片进行深度离子蚀刻获得三维支架, 形成孔道阵列, 修饰管壁使之具有细胞粘附性质, 播种在支架上的肝细胞按照类似于体内的方式排列, 在培养过程中可以从阵列顶部连续的灌注培养液到整个三维组织的每个微孔道, 能够在长时间内维持细胞活性和保持结构稳定, 为组织工程学和病理学提供良好的研究平台。

微系统技术有集成化优势, 通过微加工技术制作的微通道网络可以集成化学物质混合、细胞的操纵运输和产物监测等步骤, 在芯片上实现细胞成分分析。Ocvirk 等^[4]在玻璃微流体芯片上通过泵吸方法实现细胞悬浊液、培养基和裂解剂的同步进样, 在微通道管道内实现单细胞化学裂解, 然后利用荧光方法完成裂解产物半乳糖苷酶(β -galactosidase)的分析(图1), 该方法将分离的两个实验集成到单片连续进行, 简化检测方法, 可进行高通量分析, 并且节约试剂。

收稿日期: 2007-05-21 接受日期: 2007-07-19

上海市科委基金(No.051111019, No.0552nm015, No.0652nm016, No.06JC14081), 上海 AM 基金(No.0510)和国家重点基础研究发展规划(973 计划)(No.2005CB724305)资助项目

* 通讯作者。Tel: 021-62511070-8703, E-mail: jinqh@mail.sim.ac.cn



图1 细胞裂解、产物分离、检测芯片示意图^[4]

2 软光刻技术用于细胞的微操作和图形化

细胞在空间的分布以及细胞外基质的性质等都是影响细胞功能状态的重要因素,利用微系统平台对细胞进行微操作和图形化可以研究上述因素对细胞状态和功能的影响。目前广泛采用软光刻技术进行细胞的微操控和图形化(cell micropatterning)。

软光刻技术实现细胞图形化是以自组装分子单层和弹性印章等技术为基础,通过微接触压印或微流体网络等方法对表面进行修饰,形成细胞贴附生长的图形化的区域,使细胞选择性的贴附生长形成细胞图形。Cuvelier等^[5]通过软光刻技术进行细胞分布控制,研究单个红细胞在蛋白质修饰的基底上的分布动力学。Chen等^[6]利用微接触印刷的方法形成细胞外基质(ECM)微岛,研究微岛的形状和面积对细胞生长状态的影响,研究表明细胞生长的形状对细胞是否发生凋亡有重要作用。Lauer等^[7]利用软光刻技术可以准确地将细胞固定在微电极器件表面的记录点上,可用于探测记录大量细胞的电生理信号,也可用于细胞电刺激方面的研究。Kaji等^[8]采用软光刻的方法在微流体通道内形成并排线性心肌细胞微图案,同时观察单排细胞对不同的缓冲液刺激响应(图2)。

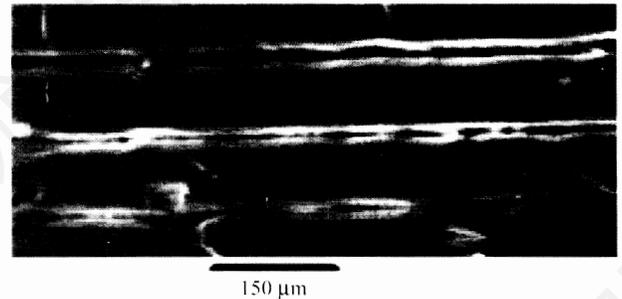


图2 并行排列的心肌细胞微图案^[8]

3 微流体技术用于细胞迁移和剪切力作用研究

3.1 层流和扩散效应

微系统在结构尺寸上的减小使流体在微通道内流动的时候的雷诺系数远小于1,因此微结构中流体的惯性效应可以忽略,在微通道内的流体不会对流混

合,而是以层流的状态流动;在微尺度的条件下,宏观体系中忽略的分子扩散效用变得非常显著,因此在微系统平台上进行细胞实验可以利用微流体的层流和扩散效应形成的浓度梯度进行研究。

利用微流体形成的细胞外基质的浓度梯度是实现细胞高通量检测的重要方法。Kaji等^[8]在微流体管道内利用层流效应使缓冲液中的形成含与不含正丁醇的区域,形成微流体局部化学性质的差异,使微管道内线形排列的心肌细胞受到不同性质的缓冲液刺激,可以同时观测到其受到不同缓冲液刺激时的响应,进行并行分析。Lin等^[9]制作Y型微流体通道,在分叉口两端通入不同的液体,通过扩散效应形成稳定浓度梯度施加于人类T细胞,可以观测T细胞对特定物质的浓度梯度的趋向性,为以后进行高通量的研究奠定基础。Li Jeon等^[10]设计的观察趋化因子浓度梯度对神经细胞化学趋向性运动影响的微流控芯片,可以观察到趋化因子均匀分布时细胞作自由运动;趋化因子浓度梯度为线性时,均匀分布和单侧分布的细胞

朝特定方向迁移; 以及线性浓度梯度反向时的细胞迁移的情况。

3.2 剪切力应用

机械负载和剪应力对体内细胞的发育成长非常重要。机械作用(mechanical interactions)对于保持成骨细胞维持在能够用于骨骼工程学的程度有重要作用。Leclerc 等^[11]通过微系统技术能够制作的三维的支架和流体网络模拟体内骨骼生长环境, 用流体传递细胞所需的营养物质, 并且给成骨细胞施加生理学水平的剪应力(图3)。研究结果表明在三维微器件内以静态和 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 流速的动态培养方式, 成骨细胞活性的重要指标碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的浓度分别比在盖有聚二甲基硅氧烷(PDMS)的表面皿培养提高了 3 倍和 7.5 倍, 从而证实了成骨细胞可以在微系统中以动态的方式进行培养, 并且其ALP的活性被加强, 为更好的观察骨骼细胞的生长和分裂以及将来应用规模更大的微系统器件进行骨组织研究奠定了良好的基础^[11]。血液流动产生的剪切力对血管壁最内层的内皮细胞的功能和形态有着重要的影响, Song等^[12]克服以往剪切力刺激不足以及无法并行高通量分析的缺点, 通过计算机控制的压电探针挤压 PDMS 材质的微流体芯片产生剪切力, 施加于微流体

通道内生长的内皮细胞, 研究剪切力对内皮细胞产生的影响。

4 芯片毛细管电泳用于细胞分选和单细胞分析

芯片毛细管电泳技术借助于离子或分子在电迁移或分配行为上的差异, 对样品中的多种组成成分进行高速分离分析的技术。芯片毛细管电泳技术可用于细胞的分离和运动状态的监测。Becker 等^[13]利用介电电泳在微流体通道内从稀释的血液中分离出癌症细胞。Wang 等^[14]在微系统芯片上利用介电电泳选择过滤器对细胞进行分类, 并且集成微芯片流式细胞仪实时监测细胞分类的效率, 研究流速、电压、样品导电率和电场频率等因素对细胞分类的影响, 探索细胞分离的最优化条件。应用该微系统进行死活酵母细胞的分类, 通过调整参数, 在介电电泳选择过滤器上捕获的活细胞超过 90%。

细胞可以在外加电场的情况下裂解, 利用毛细管电泳分离待测分析物, 实现胞内成分分析。Munce 等^[15]在单片多通道微系统平台上, 并行实现单细胞并行电泳分析(图 4a)。该芯片利用光钳技术进行单细胞分离, 将细胞捕获至粗细管道分界处, 在外加电场

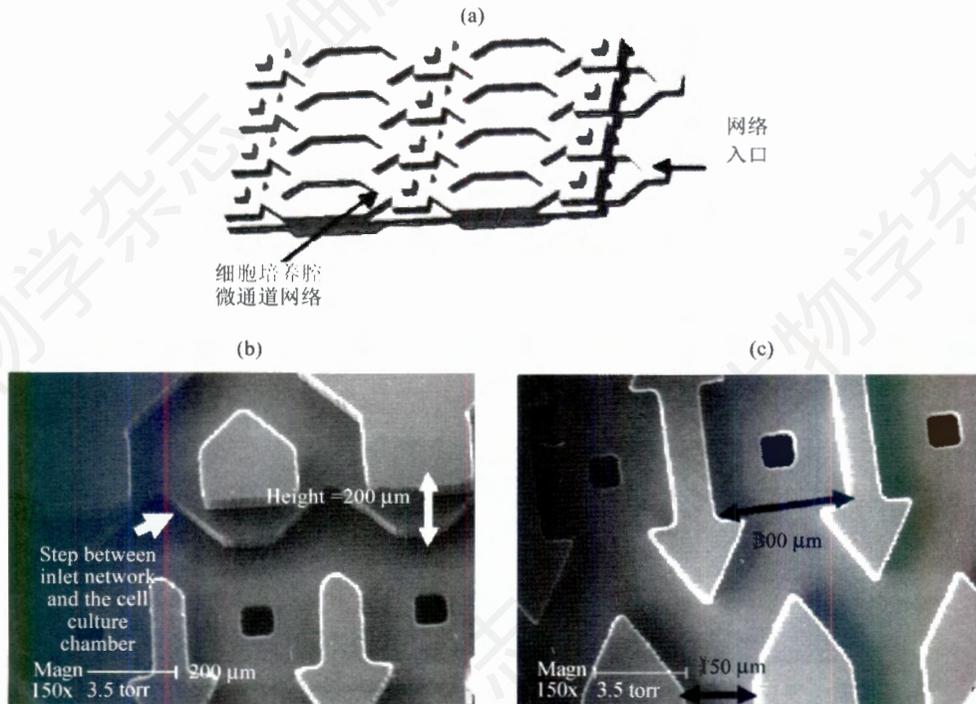


图3 用于研究微流体情况下的成骨细胞状态的微结构图^[11]

(a)整体示意图; (b)网络入口的扫描电子显微镜图; (c)细胞培养腔微通道网络的扫描电子显微镜图。

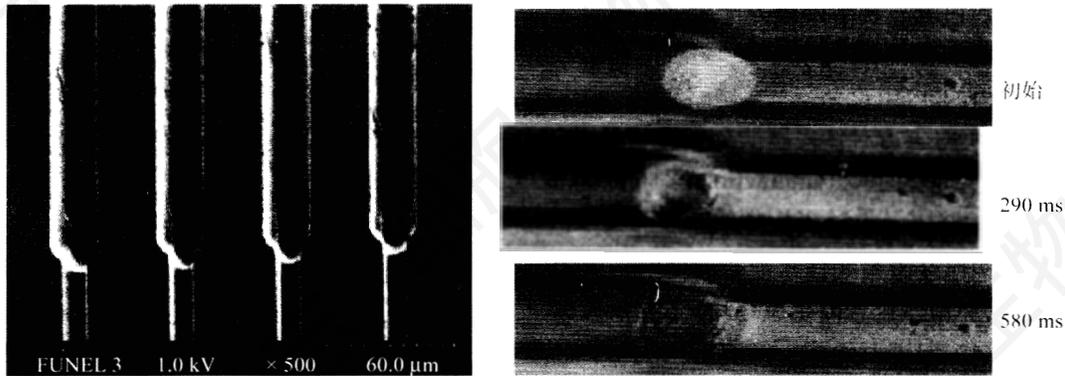


图4 毛细管电泳裂解细胞图^[15]

(a)并行通道扫描电子显微镜图,上部细胞进入管道宽度20 μm,下部分离管道宽度10 μm;(b)外加电场条件初始时、290 ms、580 ms时细胞裂解情况

的作用下对钙黄绿素标记的急性白血病细胞进行裂解,电泳分离裂解产物进行检测(图4(b))。该方法采用多通道同时检测可以有效地提高通量,并且通道内单细胞检测可以有效避免干扰提高灵敏度。

5 微电极技术用于细胞刺激和代谢产物测定

细胞信号的检测对于细胞传感器等方面的研究有重要意义,由于光学检测系统不便于集成,因此在细胞微系统内集成微电极阵列进行生物信号的测量得到广泛的应用。

像神经细胞、心肌细胞这样的电兴奋细胞尤其适合作为传感单元,通过微电极阵列或者场效应管阵列可以探测到因外界环境发生变化引起细胞的电位变化,从而获得外界信息。Pearce等^[16]在布满微电极阵列的基底上贴合具有微结构的PDMS,形成微通道网络,利用层流形成局部温度差异刺激神经细胞,实时检测神经细胞对于温度的响应信号。结合细胞微图形化使细胞准确的分布在测量点上可以提高检测

信号的准确性。James等^[17]采用软光刻方法使神经细胞准确的贴壁在平面电极刺激点表面生长,可利用微电极对细胞进行准确的刺激和信号的测量。

集成于微系统平台的电极也可用于细胞某些不稳定代谢产物的检测。例如,内皮细胞代谢的NO,在心血管系统中发挥重要的作用,代谢量很低且不稳定,因此采用常规的方法很难检测到,必须采用灵敏度高且能实时检测的方法进行测量。采用微加工技术制作的微电极阵列可以很好的应用于NO的实时检测。Spence等^[18]利用微注模技术制作碳黑电极(carbon ink electrode),并用nafion对其进行修饰增强对NO的选择性,利用该微电极可实时监测抑制剂和诱导剂对内皮细胞代谢产生NO的影响。Isik等^[19]介绍了一种生物兼容性很强的三维微电极阵列测量内皮细胞代谢的NO,该阵列避免内皮细胞与电极直接接触导致细胞死亡,引起测量误差(图5)。由于微电极与细胞之间距离很近,对代谢产物有极快的响应速度,并且对电极进行修饰后使其对测量的对象有很

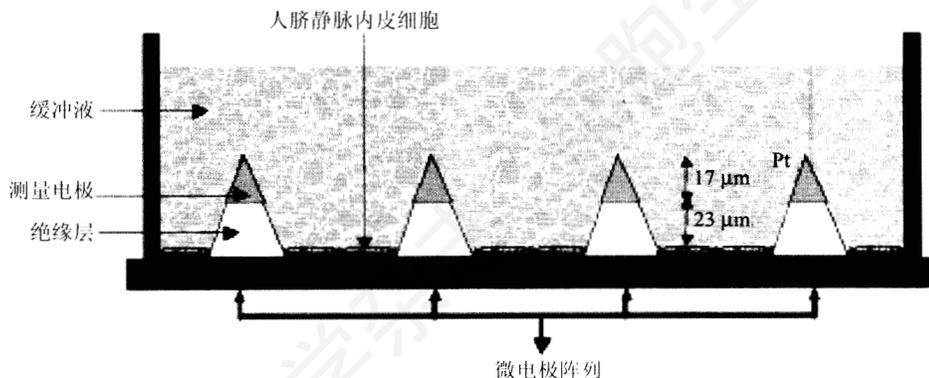


图5 用于NO测量的电极微阵列示意图^[18]

高的特异性, 由于其有高度的灵敏性, 因此微电极阵列应用于细胞传感器可以实时检测代谢产物, 真实的反映细胞代谢产物的状况。

6 展望

细胞微系统技术作为常规细胞研究实验的有益补充, 已经在细胞领域的基础研究和应用研究发挥出了优势。但是, 到目前为止, 细胞微系统平台的主要技术还只能对简单的样本进行分析, 多步集成的检测仪器还只是处在起步阶段, 与实际应用还有较大差距。在微系统上进行实验常常需要做常规的实验或者是预实验作为基础或者是验证, 有的时候方法并不简单, 因此在实际工作中有很多挑战, 但这都是细胞微系统发展过程中必须经历的步骤。一个应用于细胞研究的微系统平台与现目前的研究平台相比应具有更小的进样体积、更高的精确度、更高的通量、更强的操控能力, 而且整个系统应该具有更好的可重复性^[1]。

目前细胞微系统技术进行细胞研究存在着巨大的挑战, 但是近几年的研究取得的可喜的进展给人们

点燃了希望, 将来很有可能制造出类似于实验室一样的功能全面的细胞微芯片系统。微系统技术结合细胞技术制造的仪器或者器件必将在微系统领域、生物研究领域、医疗诊断领域发挥重要的作用。

参考文献(References)

- [1] El-Ali J *et al. Nature*, 2006, **442**: 403
- [2] Toh YC *et al. Lab Chip*, 2007, **7**: 302
- [3] Powers MJ *et al. Biotechnol Bioeng*, 2002, **78**: 257
- [4] Ocvirk G *et al. Proc IEEE*, 2004, **92**: 115
- [5] Cuvelier D *et al. Eur Biophys J*, 2003, **32**: 342
- [6] Chen CS *et al. Science*, 1997, **276**: 1425
- [7] Lauer L *et al. IEEE Trans Biomed Eng*, 2001, **48**: 838
- [8] Kaji H *et al. Lab Chip*, 2003, **3**: 208
- [9] Lin F *et al. Lab Chip*, 2006, **6**: 1462
- [10] Li Jeon N *et al. Nat Biotechnol*, 2002, **20**: 826
- [11] Leclerc E *et al. Biomaterials*, 2006, **27**: 586
- [12] Song J W *et al. Anal Chem*, 2005, **77**: 3993
- [13] Becker FF *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 860
- [14] Wang Z *et al. Electrophoresis*, 2006, **27**: 5081
- [15] Munce NR *et al. Anal Chem*, 2004, **76**: 4983
- [16] Pearce TM *et al. Lab Chip*, 2005, **5**: 97
- [17] James CD *et al. IEEE Trans Biomed Eng*, 2000, **47**: 17
- [18] Spence DM *et al. Analyst*, 2004, **129**: 995
- [19] Isik S *et al. Biosens Bioelectron*, 2005, **20**: 1566

Cell Microsystem Technology and Its Application

Jian-Bo Shao^{1,2}, Qing-Hui Jin^{1*}, Jian-Long Zhao¹

¹Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China;

²Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Recently cell microsystem technology has now been a focus in cell biology research. Cell microsystem, based on micro-electromechanical system (MEMS) technology combined with cell biology, performs cell culturing, monitoring and analysis totally on a microsystem chip. It is a novel platform for cell biology research and has achieved amazing progress in recently several years. Maybe it will be the next revolution tools for biological discovery. In this paper, we reviewed the typical methods of cell microsystem, including 3-dimensional microstructure, soft lithography, microfluidics, chip-based capillary electrophoresis, microelectrode array, also the applications in cell biological and life science research had been introduced.

Key words cell microsystem; microstructure; soft lithography; microfluidic; chip-based capillary electrophoresis

Received: May 21, 2007 Accepted: July 19, 2007

This work was supported by the Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (No.051111019, No.0552nm015, No.0652nm016, No.06JC14081), Shanghai Applied Materials Research and Development Fund (No.0510) and the National Basic Research Program of China (973 Program) (No.2005CB724305)

*Corresponding author. Tel: 86-21-62511070-8703, E-mail: jinqh@mail.sim.ac.cn