

一种基于微流控芯片和电化学自组装单层的多细胞表面构图方法

吴建璋^{1,2}, 邵建波^{1,2}, 郑允焕^{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 100049

摘要: 细胞表面构图技术对于研究细胞以及细胞间相互作用具有重要意义。近年来随着微加工技术与表面修饰技术的发展, 出现了多种细胞表面构图方法。本研究介绍一种基于微流控芯片和电化学自组装单层修饰的多细胞表面构图方法。该方法通过软光刻技术加工具有2种细胞拦截坝结构阵列的微流控通道来实现2种细胞在芯片表面准确定位; 通过表面修饰具有阻碍细胞贴壁特性自组装单层来实现对细胞生长区域的限制; 最终实现2种不同细胞近距离表面构图。该方法的优点在于, 可以使多种细胞根据需要进行准确的表面构图, 细胞区域之间没有物理隔离共享培养微环境, 允许不同种细胞通过细胞分泌因子进行相互作用, 基底透明表面开放可以使用多种观测手段。该方法可以用于不同种细胞间相互作用的研究。

关键词: 微流控芯片, 细胞构图, 自组装单层, 电化学解吸附, 细胞共培养

Patterning different cells based on microfluidics and self-assembled monolayers

Jianzhang Wu^{1,2}, Jianbo Shao^{1,2}, Yunhuan Zheng^{1,2}, Qinghui Jin¹, and Jianlong Zhao¹

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

2 Graduate University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China

Abstract: The ability to pattern multiple cells through precise surface engineering of cell culture substrates has promoted the development of cellular bioassays, such as differentiation, interaction and molecular signaling pathways. There are several well developed ways to pattern cells. This report describes a method for patterning multiple types of cells based on microfluidics and self-assembled monolayers. We developed two types of micro-dam structures by soft-lithography to locate cells precisely and modified the substrate by a kind of self-assembled monolayer with property of electrochemical desorption to confine cells in specific areas. Finally we could pattern an array of two different types of cells closely and precisely. Cells were confined in specific areas but still shared the same microenvironment, so they could interact through soluble molecules. The substrate was transparent and open, so we could easily apply several instruments for research. With these merits, this cell chip is appropriate for investigating the interaction

Received: March 31, 2009; **Accepted:** June 10, 2009

Supported by: National Science Foundation of China (No. 30771115), National Program on Key Basic Research Project (973 Program) (Nos. 2007CB714502, 2007CB936000), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA042106), Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (Nos.0752nm021, 0852nm00400, 08110700200, 08540705800).

Corresponding author: Qinghui Jin. Tel: +86-21-62511070-8708; E-mail: jinqh@mail.sim.ac.cn

Jianlong Zhao. Tel: +86-21-62511070-5801; E-mail: jlzhao@mail.sim.ac.cn

国家自然科学基金(No. 30771115), 国家重点基础研究发展规划(973计划)(Nos. 2007CB714502, 2007CB936000), 国家高技术研究发展计划(863计划)(No. 2007AA042106), 上海市科委项目(Nos. 0752nm021, 0852nm00400, 08110700200, 08540705800)资助。

between different types of cells.

Keywords: microfluidics, cell patterning, SAMs, electrochemical desorption, cell co-culture

随着细胞及相关研究的不断深入,人们更多地需要对细胞的生长形态和位置进行有效的控制。特别是在研究干细胞分化、细胞间相互作用信号通路、活细胞生物传感器等诸多新兴领域^[1-3],要求能够对少量细胞的形态和位置进行准确控制,即细胞构图(Cell patterning)^[4-5]。然而细胞非常微小,传统的宏观细胞培养方法缺乏有效的细胞控制手段,日渐不能满足人们对细胞研究的需要。

微加工技术(Microfabrication)的发展为细胞操控提供了强大的技术手段。通过微加工技术制作出和细胞尺寸相当的微小结构与器件,使得少量甚至单个细胞的控制成为可能。结合化学表面修饰或者微流体控制等相关技术就可以对细胞进行表面构图。通过设计不同的构图结构可以对细胞进行针对性的研究。目前广泛使用的细胞构图方法主要有2种:微压印(Microcontact printing)^[5]和微流控芯片(Microfluidics)^[6-7]。通过软光刻(Soft-lithography)工艺^[8],可以在聚二甲基硅氧烷(PDMS)聚合物表面加工出不同的微结构。微压印方法通常结合表面化学修饰技术,使用表面具有微图形的PDMS印章将具有自组装性质的分子转印到基底表面形成自组装单层(SAMs)^[9],使细胞在基底表面特定区域难以贴壁从而实现细胞构图。微流控方法则是在PDMS中制作有限制细胞通过作用的微通道结构,将PDMS层与基底结合制成微流控芯片,通过控制微流体的运动对流过的细胞进行准确的控制和定位,从而实现细胞构图。

由于通常的表面化学修饰缺乏特异性,微压印方法很难对多种细胞进行近距离表面构图。微流控方法虽然可以通过微通道结构的隔离作用阻止不同种细胞相互混杂,实现多细胞表面构图,但由于物理隔离的存在,不同区域细胞之间难以相互接触,不适合用于细胞间相互作用的研究。本研究介绍的这种方法结合了微流控和表面化学修饰方法的优点,使用具有电化学解吸附特性的自组装硫醇分子 $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$,缩写为EG6^[4,9]。使用微流控通道有选择的对EG6自组装单层进行电化学解

吸附^[10-11]。通过2种微坝结构对细胞生长区域的相对位置和形状进行准确控制。最后实现2种不同细胞在没有物理隔离的情况下近距离表面构图。该方法的优点在于:不同种细胞可以根据需要按照距离梯度方式进行表面构图;不同种细胞不相互混杂却能共享微环境相互作用;基底表面透明开放可以使用多种观测仪器。该方法可用于不同种细胞间相互作用的研究。

1 材料与方法

1.1 实验整体思路

如图1所示,(A)首先在玻璃基底表面溅射一层金;(B)将EG6酒精溶液置于基底表面,一段时间后金表面将形成具有阻碍细胞贴壁作用的EG6自组装单层^[12-13];(C)将具有微通道结构的PDMS层贴附于基底表面形成微通道,并在通道中灌注细胞培养液,在金层和细胞培养液之间施加一定大小的电场,可除去微通道中暴露出来的EG6单层使表面活化,而被PDMS覆盖区域的EG6单层仍然存在;(D)在不同通道中通入不同种细胞,通过微坝结构将细胞限

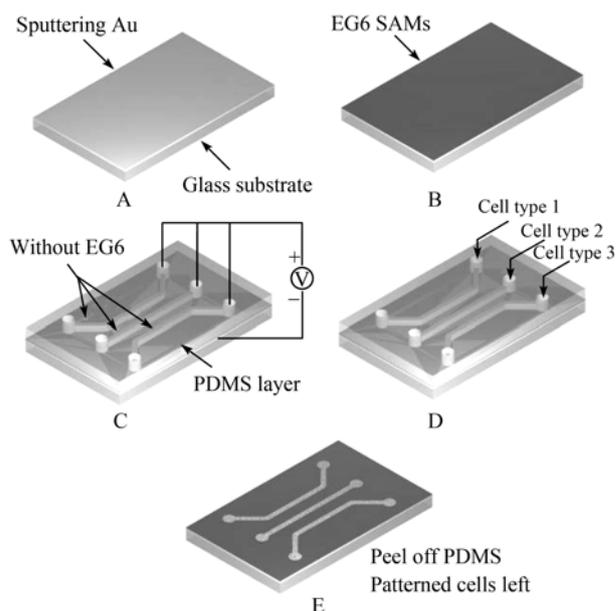


图1 实验流程示意图

Fig. 1 Schematic illustration of procedure.

制在指定区域, 由于此时通道中的 EG6 单层已经除去, 细胞一段时间后顺利贴壁; (E) 剥离 PDMS 层, 由于具有 EG6 单层的区域细胞无法贴壁, 细胞被限制在没有 EG6 的区域, 从而实现细胞表面构图。

1.2 微流控芯片设计与制作

微流控芯片 PDMS 层图形如图 2 所示。3 条 $100\ \mu\text{m}$ 宽并且相互隔离的微通道, 最多可以导入 3 种不同种类细胞而不会相互混杂。每条通道中有 6 个串联的细胞拦截微坝可以将细胞定位在坝结构区域内。坝宽均为 $60\ \mu\text{m}$, 椭圆形微坝(包括周围通道)尺寸为长轴 $300\ \mu\text{m}$ 短轴 $260\ \mu\text{m}$, 用于拦截少量细胞; 长方形微坝(包括周围通道)尺寸为 $1200\ \mu\text{m}\times 260\ \mu\text{m}$, 用于拦截较多细胞。长方形微坝单元与两侧通道中的椭圆形微坝单元之间的距离依次增加(或减小) $50\ \mu\text{m}$, 这样构图细胞可以按照距离梯度的方式进行分布^[14], 可用于观测不同种细胞间相互作用。

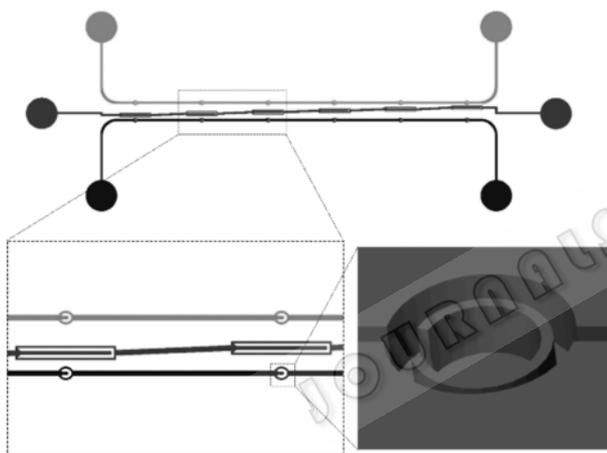


图 2 微流控 PDMS 层设计版图及微坝结构示意图
Fig. 2 Schematic illustration of PDMS layout and micro-dam structure.

PDMS 层制作工艺如图 3 所示。将硅片置于 Piranha 洗液(浓硫酸和双氧水按 5:1 混合)中煮沸 20 min, 清洗吹干, $200\ ^\circ\text{C}$ 加热 30 min 干燥。在硅片上按照 3000 r/min 甩涂 SU8-2005(MicroChem Corp, MA, USA)30 s。前烘于热板上 $65\ ^\circ\text{C}$ 加热 2 min, 升温至 $95\ ^\circ\text{C}$ 加热 4 min, 自然冷却至室温。按照图 2 中版图进行第一次曝光。后烘于热板上 $65\ ^\circ\text{C}$ 加热 1 min, 升温到 $95\ ^\circ\text{C}$ 加热 2 min, 按照 $1\ ^\circ\text{C}/\text{min}$ 的降温速率有控制地降温至室温。至此第一层的图形已经转移到 SU-8 负胶上, 这一层是形成微坝结构下方空隙的关键。第二层 SU-8 制作方法与第一层基本相同, 但

光刻时需要与第一层图形进行对准, 光刻胶采用 SU8-2050, 前烘 $65\ ^\circ\text{C}$ 加热 5 min, $95\ ^\circ\text{C}$ 加热 10 min, 后烘 $65\ ^\circ\text{C}$ 加热 2 min, $95\ ^\circ\text{C}$ 加热 5 min。专用显影液超声辅助显影 5 min, 异丙醇辅助清洗、烘干、便形成具有微通道微坝结构的 SU-8 模具。将 PDMS 液态单体(Dow Corning, Michigan, USA)与固化剂按重量比 10:1 均匀混合, 真空脱气, 倒于 SU-8 模具上, $80\ ^\circ\text{C}$ 烘箱 0.5 h。待 PDMS 固化后从模具上剥离, 打孔并切割成合适大小, 制成完成。

1.3 金基底制作和表面化学修饰

EG6 分子在金表面可以形成自组装单层^[15], 并且金具有良好的导电特性可以做为后续电化学解吸附步骤中的负极。制作透明的基底可以方便使用倒置显微镜进行观测。研究表明金层厚度小于 50 nm, 钛粘附层厚度小于 5 nm 的情况下可以保证基底的透明性^[15]。综合考虑透明性需要和加工难度, 本实验采用溅射工艺在玻璃在玻片(帆船牌, 上海)上生长 3 nm 钛层和 30 nm 金层。

将具有金层的基片浸没在 $1.5\ \text{mmol/L}$ EG6 (Prochimia, Poland)酒精溶液中约 12 h, 使金表面生长 EG6 自组装单层。将基底和 PDMS 芯片浸泡在 75% 酒精溶液中消毒 30 min, 静置于超净工作台, 待表面酒精溶液彻底挥发后将 PDMS 层紧密贴合在基底表面形成封闭的微通道。通入细胞培养液 RPMI1640 (Gibco, Invitrogen Corporation, USA)充满微通道, 静置约 2 h 使微通道内的残留气泡完全消失。以基底表面金层为负极, 金属铂为正极, 在细胞培养液和基底之间施加 1.2 V 电压 30 s, 使通道内的 EG6 自组装单层电化学解吸附。基底表面化学修饰完成。

1.4 细胞培养及活性检测

在中间微通道中导入人脐静脉内皮细胞 HUVEC-2C(ATCC, USA), 在两侧微通道中导入人肝癌细胞 SMMC-7721(中国科学院上海细胞生物研究所), 培养液使用 RPMI1640 (Gibco, Invitrogen, USA), 添加 10% 的胎牛血清(杭州四季青)和 1% 的链青双抗(杭州吉诺生物医药技术有限公司), 细胞消化液为 0.25% 的胰酶和 0.02% 的 EDTA(杭州吉诺生物医药技术有限公司)。采用重力与负压结合方式进行细胞进样。在进样孔中插入细管, 注入细胞悬浮液, 在重力作用下细胞在微通道中运动并被微坝拦

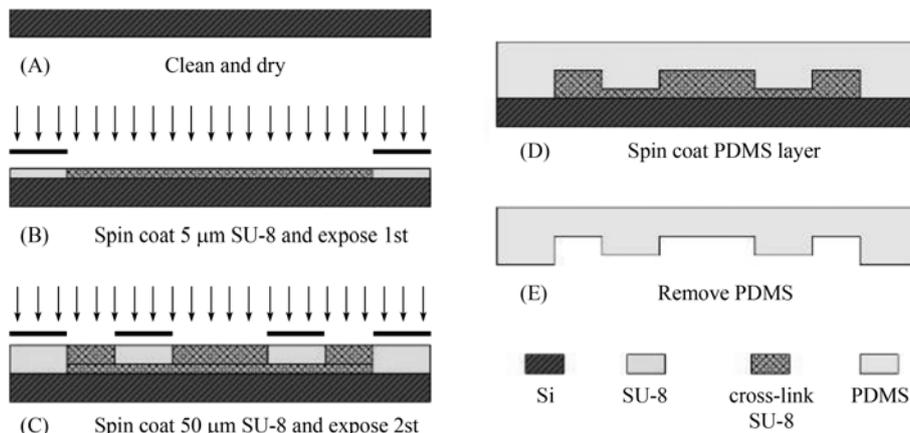


图3 PDMS层制作流程图

Fig. 3 Fabrication process of PDMS.

截下来。出样口处可用注射器缓慢抽液, 加快液流速度。培养箱中培养约 12 h, 待细胞正常贴壁, 揭下表面 PDMS 层, 添加培养液继续培养, 并分别在 36 h 和 60 h 后对细胞的生长状况进行观察。

细胞活性通过 Live/dead viability/cytotoxicity Kit 试剂盒(Molecular Probes, USA)进行检测。方法如下: PBS 缓冲液冲洗基底表面, 加入含 2 $\mu\text{mol/L}$ Calcein AM 和 4 $\mu\text{mol/L}$ Ethidium homodier-1(EthD-1) 混合液在避光条件下孵育 30 min, 然后立即在荧光显微镜(Olympus, Japan)下观察。通过多次细胞计数并计算染成绿色细胞(即活细胞)与染成红色细胞(即死细胞)的比值来评价细胞的活性状态。

2 结果与讨论

2.1 微流控 PDMS 芯片

通过微加工技术在硅片上制作的 SU-8 模具具有诸多优点。SU-8 负光刻胶可以制作高深宽比的厚膜图形, 通过多次光刻可以制作具有台阶结构的复杂图形, 加工完成的模具具有良好的力学性能和抗化学腐蚀性, 可以反复使用转印 PDMS 芯片, 节省大量材料和时间。通过 SU-8 转印制成的 PDMS 芯片同样具有多方面优点。PDMS 具有很好的透气性, 在 PDMS 芯片中生长的细胞可以透过 PDMS 层获得生长所必须的氧气。PDMS 还具有良好的透光性和生物相容性, 有利于芯片内细胞培养和实时观察。本实验中使用的 PDMS 芯片没有和基底发生不可逆键合, 在剥离后可以通过简单的清洗消毒步骤反复使用, 操作简单经济耐用。制作完成的 PDMS 芯片如图 4 所示, 3 条通道中通入不同染料溶液以示结构。

2.2 基底表面溅射金

基底表面溅射钛层和金层的厚度与基底透明程度直接相关。预实验中分别选择 4 种不同厚度参数: (A) 钛 10 nm, 金 100 nm; (B) 钛 5 nm, 金 50 nm; (C) 钛 3 nm, 金 30 nm; (D) 钛 2 nm, 金 10 nm。由于实验最后要将 PDMS 层从基底上剥离, 方案(D)虽然透明度高, 但是由于金属层太薄, 常会发生金属层剥落的现象。方案(C)可以兼顾基底透明性和金属层牢固性, 最终采用钛 3 nm 金 30 nm 的方案溅射基底。

2.3 EG6 自组装单层基底表面修饰

将具有金层的基底置于 1.5 mmol/L EG6 酒精溶液中约 12 h, 对其表面是否生长有 EG6 自组装单层进行检测。有报道^[11]使用 SPR 方法测定 EG6 对蛋白质吸附的阻碍作用。由于条件限制, 本实验采用接触角对比及小区域细胞生长限制实验的方式表征 EG6 自组装层的存在。取 3 片具有同样金层厚度的基底玻片, 2 片置于 1.5 mmol/L EG6 酒精溶液中, 一片置于不含 EG6 的酒精中, 约 12 h 后清洗氮气吹干使用接触角测量仪(KUASS, Germany)分别在基底表面对应的 5 个不同位置测量表面接触角。由于加热和电场都可以使 EG6 自组装单层分解^[9], 将浸泡过 EG6 的基底一片在烘箱中 150 $^{\circ}\text{C}$ 加热 30 min; 另一片以金层为负极, 铂电极为正极施加 1.5 V 电压 30 s, 都置于酒精中约 12 h, 清洗氮气吹干测量相同 5 个位置的表面接触角。实验数据如表 1 所示, 浸泡过 EG6 的基底接触角减小近一半, 通过加热或加电场处理后接触角恢复到以前大小。由此表明应用实验中的参数确实使金层表面生长了 EG6 自组装单层, 通过加电压又使得 EG6 单层分解。

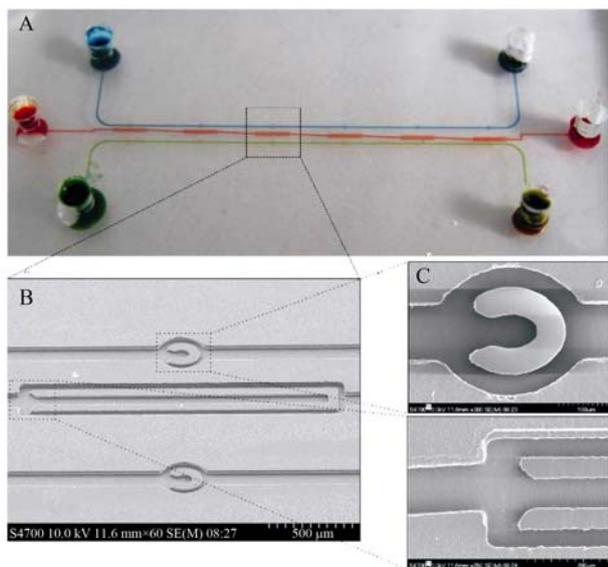


图 4 PDMS 芯片实物图(A)及 2 种微坝结构的 SEM 图 (B、C)

Fig. 4 Photograph of PDMS microfluidic chip (A) and SEM picture of two types of micro-dam structure (B, C).

2.4 细胞表面构图与细胞活性测定

为了验证 EG6 对细胞贴壁的阻碍作用, 在修饰有 EG6 自组装单层的基底表面滴加一滴 RPMI1640 细胞培养液, 并以金层为负极铂电极为正极在金层和液滴之间 1.2 V 电压 30 s, 按照设计液滴区域的 EG6 将会电化学解吸附。将消化处理的细胞 (HUVEC-2C) 悬液滴加在基底表面并置于培养箱中培

养 24 h 后如图 5 所示, 细胞被限制在液滴区域内, 表明 EG6 自组装单层确实对细胞贴壁具有阻碍作用。

将 2 种细胞(人脐静脉内皮细胞 HUVEC-2C 和人肝癌细胞 SMMC-7721)分别导入 PDMS 微通道, 在微坝区域内细胞被拦截并聚集(图 6A)。

表 1 经不同方式处理基底表面接触角大小

Table 1 Contact angle of substrate according to different treatments

Treatment\Position	1	2	3	4	5	Average
Without EG6	74.5	71.2	71.5	72.9	74.5	72.9
With EG6	39.1	44.4	44.2	43.2	45.2	43.2
Heat treatment	70.2	69.3	68.6	68.8	70.4	69.5
Electrical treatment	72.6	69.9	70.4	70.7	73.0	71.3

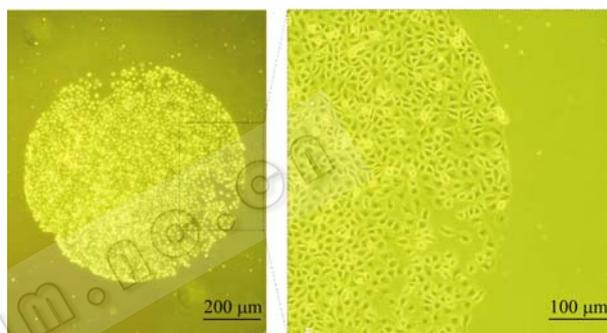


图 5 EG6 自组装单层对细胞贴壁的限制作用

Fig. 5 Resistance of EG6 SAMs against cell adherence.

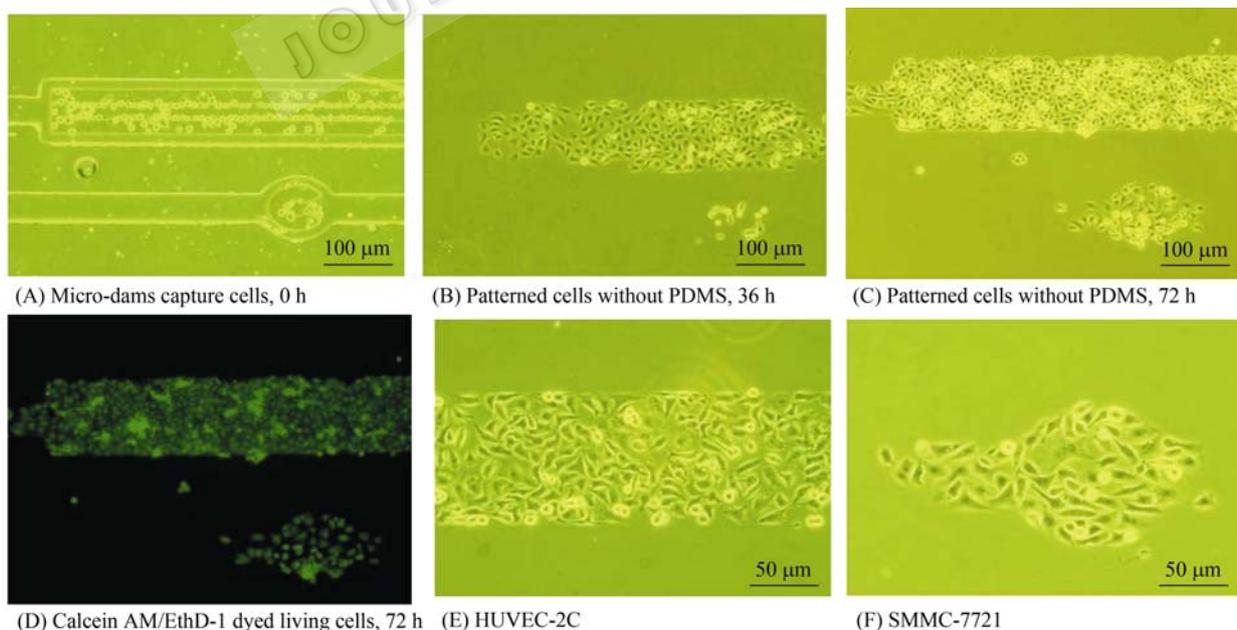


图 6 细胞在不同时间和区域的生长状况

Fig. 6 Living status of cells at different time points and locations.

在培养箱中培养约 12 h 后细胞已经在通道内贴壁, 剥离 PDMS 并更换新鲜培养液继续培养至 36 h, 图 6B 显示细胞仍然被限制在设计图形区域内。72 h 后细胞已经生长到通道内但仍然较好的限制在图形区域(图 6C)。使用细胞活性试剂盒对细胞进行染色, 其中 Calcein AM 能够将活细胞染成绿色, 而死细胞被 EthD-1 染成红色(图 6D)。通过对基底表面不同构图区域细胞进行染色, 计数并计算活细胞与死细胞数量比, 可以发现 2 种细胞的成活率都可在 95% 以上, 这表明使用本实验方法进行表面构图的细胞生长状态良好, 可以进行后续细胞间相互作用的研究。

3 结论

本实验结合了微流控和表面化学修饰细胞构图方法的优点, 使用相对简单的工艺步骤实现 2 种不同细胞在玻璃基底表面近距离细胞构图。通过本实验方法进行细胞构图具有基底透明和表面开放的优点, 可以方便地使用多种设备对细胞进行观测。通过设计微通道图形结构, 还可以使 2 种细胞按照距离梯度方式进行表面构图。构图细胞区域之间没有物理隔离, 不同细胞在不相互混杂的情况下能够共享培养液微环境, 使得细胞分泌的各种生物活性物质可以自由地扩散到整个微环境中。通过观测和分析不同位置细胞变化的不同, 在一定程度上可以反映细胞间的相互作用。利用本实验方法进行细胞间相互作用的观测将成为本课题小组下一步研究的重点, 相信本方法能够为相关研究提供一个有意义的实验平台。

REFERENCES

- [1] Borenstein JT, Terai H, King KR, *et al.* Microfabrication technology for vascularized tissue engineering. *Biomed Microdevices*, 2002, **4**(3): 167–175.
- [2] Hopp B, Smausz T, Papdi B, *et al.* Laser-based techniques for living cell pattern formation. *Appl Phys A*, 2008, **93**(1): 45–49.
- [3] Suzuki M, Yasukawa T, Shiku H, *et al.* Negative dielectrophoretic patterning with different cell types. *Biosens Bioelectron*, 2008, **24**(4): 1043–1047.
- [4] Falconnet D, Csucs G, Michelle H, *et al.* Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials*, 2006, **27**(16): 3044–3063.
- [5] Mrksich M, Whitesides GM, Patterning self-assembled monolayers using microcontact printing: a new technology for biosensors? *Trends Biotechnol*, 1995, **13**(6): 228–235.
- [6] Chiu DT, Jeon NL, Huang S, *et al.* Patterned deposition of cells and proteins onto surfaces by using three-dimensional microfluidic systems. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(6): 2408–2413.
- [7] Shao JB, Wu L, Jin QH, *et al.* Fabrication and application of a novel cell culture microchip. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(7): 1253–1257.
- [8] 邵建波, 吴蕾, 金庆辉, 等. 一种细胞培养微芯片的制作及应用. *生物工程学报*, 2008, **24** (7): 1253–1257.
- [9] Whitesides GM, Ostuni E, Takayama S, *et al.* Soft lithography in biology and biochemistry. *Annu Rev Biomed Eng*, 2001, **3**(1): 335–373.
- [10] Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, *et al.* Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem Rev*, 2005, **105**(4): 1103–1169.
- [11] Li Y, Yuan B, Ji H, *et al.* A method for patterning multiple types of cells by using electrochemical desorption of self-assembled monolayers within microfluidic channels. *Angew Chem Int Ed*, 2007, **46**(7): 1094–1096.
- [12] Jiang X, Ferrigno R, Mrksich M, *et al.* Electrochemical desorption of self-assembled monolayers noninvasively releases patterned cells from geometrical confinements. *J Am Chem Soc*, 2003, **125**(9): 2366–2367.
- [13] Kingshott P, Griesser HJ. Surfaces that resist bioadhesion. *Curr Opin Solid State Mater Sci*, 1999, **4**(4): 403–412.
- [14] Li L, Chen S, Zheng J, *et al.* Protein adsorption on oligo(ethylene glycol)-terminated alkanethiolate self-assembled monolayers: the molecular basis for nonfouling behavior. *J Phys Chem B*, 2005, **109**(7): 2934–2941.
- [15] Keenan TM, and Folch A, Biomolecular gradients in cell culture systems. *Lab Chip*, 2008, **8**(1): 34–57.
- [16] DiMilla PA, Folkers JP, Biebuyck HA, *et al.* Wetting and protein adsorption on self-Assembled monolayers of alkanethiolates supported on transparent films of gold. *J Am Chem Soc*, 1994, **116**(5): 2225–2226.