

一种简易的用于检测细胞凋亡的微流控芯片分析技术

李 远¹, 肖文海², 廖 娟¹, 刘 严¹, 米永华¹

摘要 目的 针对微流控芯片的加工、细胞培养及细胞响应分析发展一套易于被普通生物学实验室实施的微流控芯片细胞分析技术,以天然抗癌药物重楼皂苷 I 促人肺癌细胞 A549 凋亡作用分析对该技术进行验证。方法 微流控芯片加工采用了基于感光干膜的软光刻工艺;微流控芯片结构设计为储液池加直微通道,通过 ANSYS 软件对芯片的流体动力学行为进行分析;细胞培养采用间歇式细胞动态培养技术;重楼皂苷 I 对 A549 细胞的促凋亡作用通过细胞形态学改变、活/死细胞荧光染色及乳酸脱氢酶(LDH)释放进行定性和定量分析。结果 感光干膜软刻工艺加工微流控芯片简单易行;储液池加微通道结构的微流控芯片适合各类贴壁细胞培养;形态学和荧光染色实验提示重楼皂苷 I 具有促 A549 细胞凋亡作用,且促凋亡效率与浓度呈正比关系;微流控芯片上 LDH 释放定量分析结果与传统 96 孔板实验结果吻合。结论 该文展示的技术操作简单、低试剂消耗,能实现定性和定量分析结合,可在无相关微流控技术经验的生物医学实验室中推广使用。

关键词 微流控芯片;软刻工艺;感光干膜;细胞培养;细胞凋亡;重楼皂苷 I;芯片分析技术

中图分类号 R446;R965

文献标志码 A

文章编号 1674-9960(2016)05-0430-07

DOI 10.7644/j.issn.1674-9960.2016.05.017

A simple cell-based microfluidic assay technology for detection of cell apoptosis

LI Yuan¹, XIAO Wen-hai², LIAO Juan¹, LIU Yan¹, MI Yong-hua^{1*}

(1. Central Laboratory, Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China; 2. Dazu TCM Hospital, Chongqing 402360, China)

* Corresponding author, Tel: 023-85381760, E-mail: 81240967@qq.com

[Abstract] **Objective** To develop a set of cell-based microfluidic assay technologies and verify them by analyzing the apoptosis of parissaponin I, a natural anti-cancer drug, on human lung adenocarcinoma A549. **Methods** A microfluidic chip was fabricated by the standard soft-lithography technology, in which a conventional liquid photoresist was replaced by a dry film photoresist. The designed microfluidic chip had a typical structure of two liquid pools plus one straight microchannel. The fluid dynamic behavior of this chip was analyzed by ANSYS software. Cells were cultured in the microfluidic chip using a method called intermittent dynamic culture technique. The pro-apoptosis effect of parissaponin I on A549 cells was analyzed qualitatively and quantitatively using three strategies: cell morphology change, live/dead cell fluorescence staining and lactate dehydrogenase release. **Results** The results showed that the fabrication process of the microfluidic chip using a dry film photoresist based soft-lithography was simple and feasible. The morphology and fluorescence staining results showed that parissaponin I had a pro-apoptotic effect on the A549 cells and there was a positive relationship between the concentration and efficiency. The quantitative result of lactate dehydrogenase release on the microfluidic chip was consistent with that performed on the traditional 96-well plate. **Conclusion** The technologies developed in this paper have the advantages of simple operation, low reagent consumption and can be easily accepted by ordinary biomedical laboratories without such experiments for toxicology tests.

[Key words] microfluidic chip; soft-lithography; dry film photoresist; cell culture; cell apoptosis; parissaponin I; microchip analytical procedures

基金项目 重庆市自然科学基金面上项目(cstc2012jjA10046);重庆市卫生局中医药科技项目(ZY20132132);重庆市永川区创新能力建设平台项目(Ycstc2014bf5001);重庆医科大学附属永川医院院级重点研究项目(YJZD201302) 资助;重庆医科大学第五临床学院大学生科学研究与创新实验项目(201404)

作者简介 李 远,男,博士研究生,助理研究员,研究方向:生物医学微纳系统与技术, Tel: 18983022607

作者单位 1. 重庆医科大学附属永川医院中心实验室,重庆 402160; 2. 重庆市大足区中医院,重庆 402360

通讯作者 米永华, Tel: 023-85381760, E-mail: 81240967@qq.com

细胞是生命体结构和生命活动最基本的功能单元,体外细胞学研究已成为现代生命科学和医学研究的基础。一方面,大量研究报告显示微流控芯片在细胞体外研究中具有独特的优势^[1,2],与细胞相似的微流体通道尺寸、有效细胞微环境控制及细胞体内微环境模拟、减低分析试剂消耗、具备高通量和高内涵分析潜力等,目前已广泛应用于细胞生长和

分化^[3]、细胞趋化^[4]、细胞迁移^[5]和细胞药物筛选^[6]等研究中。细胞凋亡是一种由基因控制的细胞自主死亡程序,在疾病发生^[7]、药物作用机制^[8]等领域具有重要的生物学意义。相比传统的细胞凋亡分析技术,利用微流控技术研究细胞凋亡的优势体现在细胞培养、刺激和检测分析模块间的灵活组合。例如,在细胞捕获培养方面,Valero 等^[9]报道了一种实现 HL-60 细胞凋亡动态研究的微流控 V 型诱捕装置。此外,U 型坝^[10]、PDMS 池^[11]、C 型环^[12]等微结构可集成在微流控芯片上实现将细胞固定培养在特定区域。在细胞操作方面,并行化细胞处理是微流控芯片细胞分析的重要优势。其中,药物浓度生成网络是最重要的并行化处理模块,其基本思路是将一种浓度药物通过重复组合和分流循环产生不同浓度。利用该技术,郑允焕等^[13]设计了用于药物筛选的微流控细胞阵列芯片,并行考察了不同浓度的药物伊立替康对肝癌细胞的毒性。Ye 等^[14]在一片微流控芯片上集成了多个药物浓度生成单元,实现了一次实验考察不同抗癌药物的不同浓度对人肝癌细胞的细胞作用。在细胞响应分析方面,微流控细胞响应分析主要依赖于细胞形态学的改变和增殖行为。此外,一些先进和灵敏的分析技术也开始与微流控芯片技术相结合。例如,Tamaki 等^[15]将扫描热透镜显微镜检测系统和细胞培养微流控芯片集成,能在无标记情况下对单个神经母细胞瘤-胶质瘤杂交细胞凋亡过程中细胞色素 C 分布进行检测;Wolbers 等^[16]在微流控芯片上通过自体荧光检测技术从凋亡细胞中鉴别出存活细胞;荧光共振能转移(FRET)技术分析方法与微流控技术相结合能实现细胞凋亡的实时动态监测^[17,18]。如上所述,多模块集成使微流控芯片细胞分析进入高通量高内涵时代。然而,作为微流控细胞分析技术的基础技术,芯片快速成型、细胞固定培养、药物作用及细胞响应分析仍是该领域的难点。

另一方面,随着人类生活环境和经济社会变迁,全球癌症发病率呈显著上升趋势^[19]。因此,寻找潜在的抗肿瘤药物成为制药工业界和学术科研界研究重点内容之一。我国中药资源丰富,从中草药中筛选具有抗肿瘤活性药物是我国研发抗肿瘤新药的重要途径^[20]。目前,生物学实验室对天然药物分子的细胞学评价主要采用传统多孔板平台,该技术平台存在通量低、试剂消耗大、操作繁琐等问题^[21]。鉴于微流控芯片技术细胞研究的独特优势,其已在天然活性药物细胞研究领域开始引入和报道^[21,22]。然而,微流控芯片研究中涉及的相关技术,如微流控芯片的加工、细胞固定培养及细胞响应分析对于无

相关经验的生物医学实验室仍是挑战。为此,本研究从微流控芯片加工、细胞培养到细胞响应分析三大技术难点出发,发展一种简单且易于在普通生物医学实验室开展的微流控芯片细胞分析技术。重楼皂苷(parissaponin) I 是一种被证实具有抗癌作用的天然药物分子^[23]。因此,本研究以重楼皂苷 I 促人肺腺癌 A549 凋亡作用分析为例对本文发展的微流控芯片细胞分析技术进行验证。

1 材料和方法

1.1 主要试剂、设备

1.1.1 材料 重楼皂苷 I (含量为 98.36%,上海纯优生物科技有限公司),DMSO 溶解,4℃ 保存;人层粘连蛋白(美国 PROSPEC 公司);葡聚糖 $[70 \times 10^3$ (Mr),上海生工];LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity 试剂盒(美国 Molecular Probes 公司);乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒,链、青霉素,胰酶(碧云天生物技术公司),RPMI-1640 培养液、胎牛血清(Gibco 公司);Sylgard 184 型聚二甲基硅氧烷(美国 Dow Corning 公司);HQ-6100 感光干膜(长兴化工);常规化学试剂(长江化工)。

1.1.2 设备 紫外曝光灯(实验室自制);FM-360 覆膜机(杭州新彩);Harrick 等离子清洗机(PDG-32G-2);HF90 二氧化碳细胞培养箱(力康);1390 喷墨打印机(爱普生);IX71 导致荧光显微镜(奥林巴斯);CCD(QICAM fast 1394, QImaging)。

1.2 方法

1.2.1 A549 细胞培养 人肺癌细胞株 A549 由重庆医科大学附属永川医院中心实验室常规培养。A549 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液在 37℃、5% 二氧化碳条件下培养。待细胞生长至对数生长期,用 0.25% 胰酶(含 0.02% EDTA)消化细胞,1500 r/min 离心 4 min,用含 4% 的葡聚糖的 RPMI-1640 培养液重悬细胞,制成浓度约为 5×10^6 细胞/ml 细胞悬液。

1.2.2 微流控芯片设计与加工 微流控芯片采用软光刻工艺加工而成。与传统软光刻工艺不同,本研究采用感光干膜代替了液态的光刻胶作为芯片阳模。感光干膜是一种应用于印刷电路板(PCB)工艺的光聚合物材料,具有基材可黏附性、平整性、低曝光功耗及低成本等优势^[24]。利用感光干膜制备微流控芯片参考文献[25],加工流程示意图如图 1A 所示。首先将 3 层感光干膜通过覆膜机依次层压在玻璃板上使感光层厚度约为 100 μ m,将微通道图案通过爱普生喷墨打印机打印在透明胶片上制成光掩

膜,紫外线透过光掩膜对感光干膜照射 70 s,1% 碳酸钠显影制成微通道阳模;将 PDMS 基质和固化剂按重量 10:1 混合而成的预聚物浇铸在微通道阳模上,抽真空除气泡,60℃ 下固化 3 h。将固化后的 PDMS 基片从感光干膜阳模上剥离,利用平头打孔器(直径 5 mm)在微通道两侧打孔形成储液池,氧等离子表面处理(30 W,1 min)与载玻片进行不可逆键合,形成玻璃-PDMS 复合微流控芯片。基于感光干膜软刻工艺加工微流控芯片所需主要设备照片如图 1B 所示,价格约为 5.0 万人民币。为分析微流控芯片性能,通过有限元分析软件 ANSYS 14.0(美国 ANSYS 公司)对微通道内流体动力学行为进行分析。

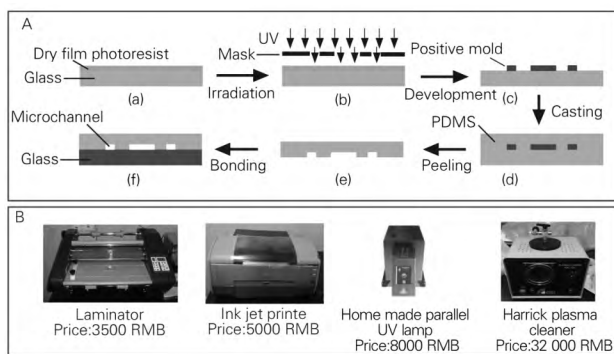


图 1 基于感光干膜软光刻工艺加工微流控芯片
A. 加工流程示意图; B. 加工主要设备图片

1.2.3 微流控芯片上 A549 细胞培养 微流控芯片上细胞培养包括 3 个步骤:芯片消毒、微通道修饰及细胞加载培养。芯片消毒:紫外灯(UV)近距离照射 30 min,70% 乙醇冲洗微通道 5 min,PBS 冲洗微通道 2 次;微通道修饰:在微通道内注入浓度为 0.1 mg/ml 的人层粘连蛋白溶液,37℃ 下孵育 1 h,PBS 冲洗微通道 2 次;细胞加载培养:将 5 μ l A549 细胞悬液滴加进微通道入口,在毛细管作用力下细胞进入微通道内,芯片放置进 37℃、5% 二氧化碳浓度培养箱中静止 1 h,在微通道一侧储液池中注满含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液,培养液在重力作用下持续进入微通道并流向另一侧储液池中,储液池中培养液 12 h 更换一次。微通道细胞形貌通过光学显微镜明场观察,细胞活性通过细胞存活/死亡检测试剂盒进行荧光染色分析。为验证微流控芯片细胞培养的通用性,按上述方法进行了人肾上皮细胞 293、细胞血管内皮细胞 EA. HY926、原代人嗅黏膜神经细胞及人膀胱癌 T24 细胞培养。

1.2.4 细胞响应分析

1.2.4.1 微通道内 A549 细胞形态学改变分析 通过倒置光学显微镜明场观察微通道内培养不同时间的 A549 细胞形态,通过钙黄绿素乙酰甲酯(Calcein-

AM) 荧光染色分析培养的细胞活性。待微通道内 A549 细胞融合度达到 >90% (48 h),吸出两端储液池中的细胞培养液,将 50 μ l 含不同重楼皂苷 I 浓度的细胞培养液(浓度分别是 0、2、4、6、8、10 mg/ml)加入不同微通道一侧的储液池,放入细胞培养箱中孵育 8 h 后,倒置显微镜观察分析 A549 细胞在不同浓度重楼皂苷 I 作用后形态学改变。

1.2.4.2 微通道内 A549 细胞存活/死亡荧光染色分析 微通道内 A549 细胞经过不同浓度重楼皂苷 I 处理后,吸出微通道两端储液池中细胞培养液,在一端储液池中加入 PBS 冲洗 2 次,吸除 PBS。在微通道一侧储液池加入 50 μ l 含 2 μ mol/L Calcein AM 和 4 μ mol/L ethidium homodier-1 (EthD-1) 的细胞存活/死亡荧光染料,室温下孵育 30 min,吸除荧光染料,PBS 冲洗 2 次。通过倒置荧光显微镜对微通道内细胞荧光图像进行观察,拍照,用图像分析软件 Image ProPlus 6.0(media cybernetic)对图像进行分析。

1.2.4.3 微通道内 A549 细胞的乳酸脱氢酶释放分析 微通道内细胞毒性采用乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH) 释放实验进行评估。分析流程如下:实验分为无细胞的空白对照微通道,未经重楼皂苷 I 作用的样品对照微通道和最大酶活性微通道,不同浓度重楼皂苷 I 作用的样品处理微通道。重楼皂苷 I 作用 7 h 时,在最大酶活性微通道储液池中加入 5 μ l LDH 释放试剂,放入细胞培养箱中孵育 1 h。随后从所有微通道储液池中吸出培养液,离心后将 50 μ l 上清液加入 96 孔板中,接着在每孔中加入 25 μ l LDH 检测工作液,室温避光孵育 30 min,多功能酶标仪测量 490 nm 处吸光度,测量采用 620 nm 波长作为参考波长。每孔的吸光度减去空白对照的吸光度后,细胞毒性(%) = (样品处理吸光度 - 样品对照组吸光度) / (细胞最大酶活性吸光度 - 样品对照孔吸光度) $\times$ 100。

2 结果与讨论

2.1 微流控芯片结果设计与加工

微流控芯片的快速加工是开展微流控芯片分析的基础,软光刻技术是实验室加工微流控芯片重要工艺之一。软光刻技术的主要原理是用 PDMS 聚合物将阳模图案复制出来,从而获得有特定结构图案的 PDMS 基片^[24]。阳模是微流控芯片加工的关键,主要以液态 SU-8 光刻胶为基础,在洁净空间通过光刻技术加工而成。该技术主要缺点在于需要昂贵的仪器设备及严格的操作流程,在一定程度上限制了大多数生物医学实验室对该技术的应用。相比而

言,本研究采用一种低成本的感光干膜替代了液态光刻胶,不但降低了微流控芯片加工成本和难度,还无需额外洁净空间和大型设备,更易被普通生物学实验室采用加工。同时,在没有配置其他专业设备的基础上,利用该法能加工的微通道宽度最低为 50 μm ,深度范围为 30 ~ 200 μm 。为简化芯片结构复杂度,避免引入外围的灌流设备,本研究设计的微流控芯片结构由储液池和直微通道组成,储液池内的液体样品在静水压作用下进入微通道。微流控芯片实物图和示意图如图 2 所示,含 6 条独立的平行直微通道,因此一片芯片上可独立实施 6 次实验。每条微通道的长、宽、深分别为 5 mm, 500 μm 和 100 μm ,储液池直径为 5 mm,深 5 mm,一个微通道内单次分析试剂耗量约为 50 μl 。

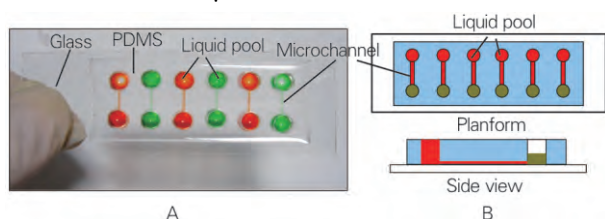


图 2 基于感光干膜软光刻工艺加工 PDMS-玻璃微流控芯片
A. 微流控芯片实物图,红绿颜料指示储液池和微通道; B. 微流控芯片结构示意图,上:俯视图,下:侧视图

储液池式微流控芯片流体动力学行为的数值有限元分析结果如图 3 所示。图 3A 为将液体样品加入微通道一侧的储液池(直径为 5 mm)后 10 s 和 700 s 时样品体积分数云图。该图可见液体样品将通过微通道流入另一侧储液池,当两侧储液池液面高度相同时,液体流动停止。图 3B 为微通道内流体流动速度与时间的关系曲线。结果可知随着时间的延长,微通道内流体流动速度逐渐降低,其原因为两侧储液池液面高度差随时间延长而降低,从而导致推动微通道内液体流动的静水压差降低。微通道内典型的液体流场矢量图如图 3B 所示,显示微通

道内流体沿微通道平行方向流动,呈典型的层流模式。此外,图 3B 还显示储液池直径大小影响微通道内流体流动行为。即储液池直径越大,微通道内流体流动持续时间越长,速度降低越慢,其原因与微通道两侧储液池间静水压差改变模式有关。因此,改变储液池直径可作为一种微通道内流体流动行为的调控策略。相比文献报道的通过改变储液池高度调节模式^[27],本策略可避免额外的储液池加工和计算储液池液面高度的步骤。

2.2 微流控芯片细胞培养

微流控芯片上成功的细胞培养是进行细胞分析的基础,其技术关键是在空间受限的微通道内为细胞提供营养物质。微通道内细胞主要采用灌注式培养^[28],即通过外围流体灌注设备使细胞培养液持续在微通道内流动,从而为细胞提供营养物质并将细胞代谢废物移除。然而,培养液流动产生的流体剪切力将对细胞造成一定损伤,同时微流控芯片与外围液路的接口问题使细胞培养操作变得复杂^[29]。细胞静态培养是最常使用的方式,该法虽不对细胞造成损伤,但将静态培养技术应用在空间受限的微通道内,仅通过扩散作用细胞常不能获得足够的营养物质。为此,本研究在参考文献^[30]的基础上设计了间歇性细胞动态培养技术。该技术是利用微通道两侧储液池间建立的液体静水压驱动培养液流过细胞培养微通道,从而为细胞生长提供足够的营养物质。细胞培养过程中每 8 h 间隔移除微通道两端储液池中的旧培养液,同时在微通道一侧储液池中加入新鲜培养液。该法不但能为细胞提供足够营养物质,避免损伤生长中的细胞,而且仅通过对储液池的液体更换就能完成微流体操作和细胞培养,降低了实验难度。微通道内采用间歇式动态细胞培养技术培养的 A549 细胞的相差显微形态图见图 4A。结果显示, A549 细胞能在微通道内黏附、铺展和增殖,培养 48 h 细胞就能铺满微通道,进一步 Calcein AM

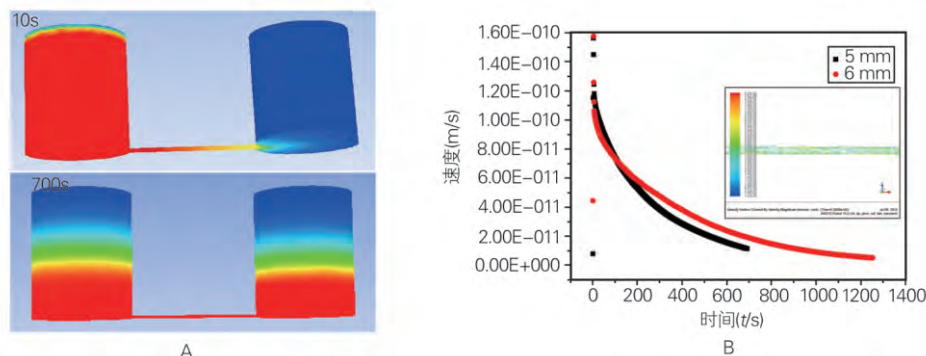


图 3 微流控芯片流体动力学行为有限元分析结果
A. 微流控芯片上液体样品体积分数分布云图; B. 微通道内流体流动速度-时间曲线,插图为微通道内流体流动矢量图

荧光染色显示细胞处于存活状态。为验证储液池式微流控上通过间歇性细胞动态培养技术进行细胞培养的通用性,本研究还进行了人肾上皮细胞株 293, 血管内皮细胞株 EA.hy926, 人原代嗅黏膜细胞及人

膀胱癌细胞 T24 微流控芯片培养,培养 48 h 后微通道内细胞形态学如图 4B 所示。结果显示上述 4 种细胞均能在微通道内增殖,也进一步说明微流控芯片细胞培养策略具有优良的通用性。

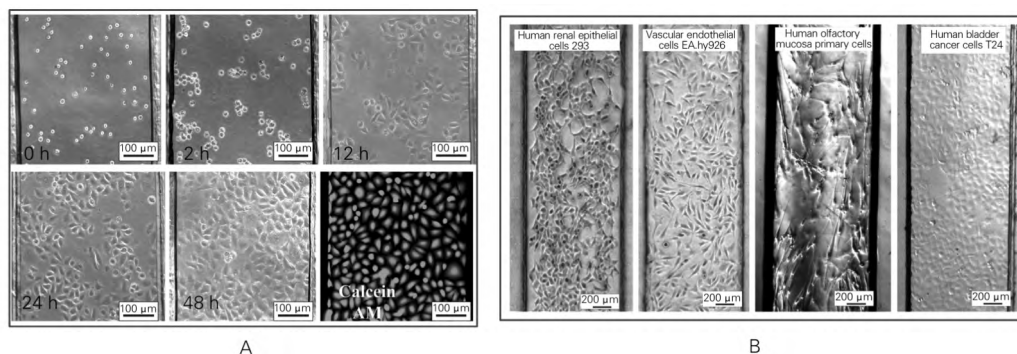


图 4 微通道内细胞培养

A. 微通道内 A549 细胞培养不同时间点的细胞形态及细胞存活荧光分析; B. 不同类型细胞在微通道内培养 48 h 后的显微形态学图像

2.3 微通道内 A549 细胞形态学改变

对微通道内 A549 细胞进行药物作用采用上述的依赖静水压力驱动的方法,即在微通道一侧储液池加入含不同浓度的重楼皂苷 I 细胞培养液,在静水压力作用下流过微通道内 A549 细胞并对 A549 细胞进行刺激。图 5 为不同浓度重楼皂苷 I 作用微通道内 A549 细胞 8 h 后细胞的形态学。从图 5 可见, A549 细胞在重楼皂苷 I 作用后,细胞收缩变圆,从基底脱离,呈凋亡形态。随着重楼皂苷 I 浓度上升,细胞收缩变圆数量增加,重楼皂苷 I 浓度达到 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,变圆细胞比例接近 100%。在未经重楼皂苷 I 作用的微通道内, A549 细胞呈梭形,良好铺展,呈正常生长状态。因此,通过对微通道内细胞形态学的分析能初步验证重楼皂苷 I 体外促 A549 细胞凋亡的效应。重楼皂苷 I 诱导肿瘤细胞凋亡的作用机制包括阻滞肿瘤细胞增殖周期、影响癌基因和抑癌基因的表达、影响细胞凋亡信号传导等^[5]。

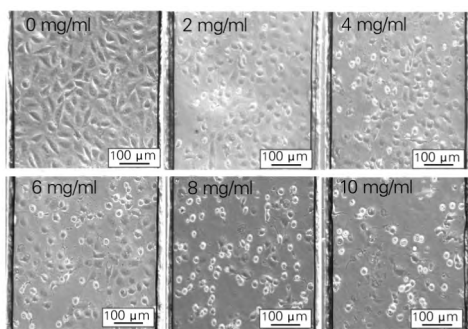


图 5 不同浓度重楼皂苷 I 作用微通道内 A549 细胞 8 h 后细胞形态学改变

2.4 微通道内 A549 细胞存活/死亡荧光染色分析 为进一步量化重楼皂苷 I 浓度与 A549 细胞凋

亡强度的关系,对微通道内 A549 细胞进行荧光染色分析。分析时,将含 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Calcein AM 和 4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ EthD-1 的荧光染料混合液注入储液池中。其中, Calcein AM 能对活细胞进行荧光标记,呈绿色荧光; EthD-1 能特异标记死亡细胞,呈红色荧光。不同浓度重楼皂苷 I 作用微通道内 A549 细胞 8 h 后细胞荧光染色如图 6A 所示。结果显示随着重楼皂苷 I 浓度增加,微通道内存活细胞(绿色)数量降低,该结果与形态学观察结果(图 5)相似。以未经重楼皂苷 I 处理的微通道活细胞数量为对照,重楼皂苷 I 浓度与微通道内活细胞残留率间的关系如图 6B 所示。值得注意的是,在对重楼皂苷 I 处理组的微通道内 A549 细胞进行荧光观察时未见微通道内红色荧光标记的死细胞,其原因在于荧光染色分析过程中死细胞从微通道内被冲洗掉。

3.5 微通道内 A549 细胞毒性分析

微通道内 A549 细胞毒性分析采用 LDH 释放实验。LDH 释放量是衡量细胞膜完整性的重要指标,当细胞凋亡或坏死造成细胞膜结构破坏导致细胞浆中的 LDH 释放到培养液中,通过检测培养液中 LDH 的活性可实现细胞毒性的定量分析。图 7A 为不同浓度重楼皂苷 I 与 A549 细胞毒性的关系曲线。结果显示,随着重楼皂苷 I 浓度增殖, A549 细胞 LDH 释放率增强,细胞毒性越大,该结果与细胞形态学和细胞存活率分析结果相似。为进一步验证微流控芯片进行细胞毒性分析方法的可靠性,通过与传统 96 孔板平台上进行的 LDH 释放实验结果进行比较。结果显示两种不同平台获得的不同浓度重楼皂苷 I 对 A549 细胞毒性具有相同的趋势。此外,相比 96 孔板实验平台,微流控芯片上测量的重楼皂苷 I 的

细胞毒性值更高,特别在 2 和 4 $\mu\text{g/ml}$ 低浓度情况下。推测其原因与微流控芯片上的流动环境和空间受限条件下细胞与药物作用更充分有关;同时,流动条件是否增强细胞对重楼皂苷 I 作用的敏感性也将在下一步研究工作中考虑。

为进一步验证本文发展的微流控芯片技术的多功能性,本研究在微流控芯片上通过 LDH 释放实验考察了不同浓度重楼皂苷 I 对人肾上皮细胞株 293、血管内皮细胞株 EA.hy926、人原代嗅黏膜细胞及人膀胱癌细胞 T24 的细胞毒性,以此来分析重楼

皂苷 I 作用的细胞特异性。重楼皂苷 I 分别作用 4 种不同细胞 8 h 后细胞毒性结果如图 7B 所示。结果显示,重楼皂苷 I 对 4 种细胞均有细胞毒性,且细胞毒性随重楼皂苷 I 浓度增大而增大。同时,不同细胞对重楼皂苷 I 响应存在差异。其中,T24 细胞响应最为敏感, IC_{50} 值为 4.8 $\mu\text{g/ml}$ 。而人原代嗅黏膜细胞敏感性最低, IC_{50} 值为 6.6 $\mu\text{g/ml}$ 。上述结果初步提示重楼皂苷 I 的细胞毒性与细胞成瘤恶性程度有一定相关性,但具体作用机制还有待进一步验证。

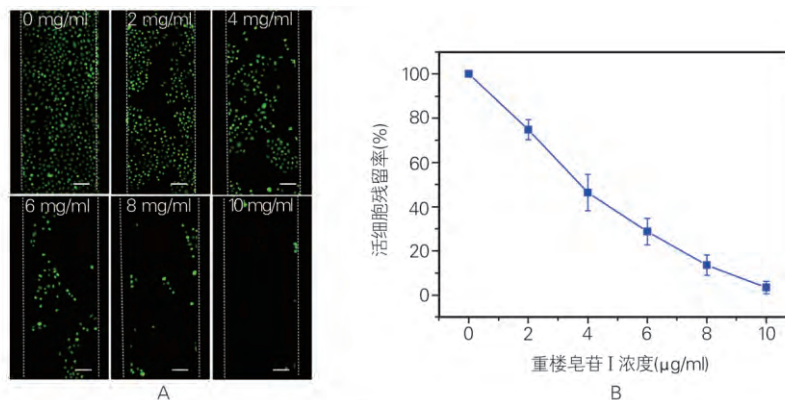


图 6 微通道内 A549 细胞存活/死亡荧光染色分析

A. 不同浓度重楼皂苷 I 作用后微通道内 A549 细胞荧光显微镜; B. 重楼皂苷 I 浓度与微通道内 A549 细胞存活率间关系曲线

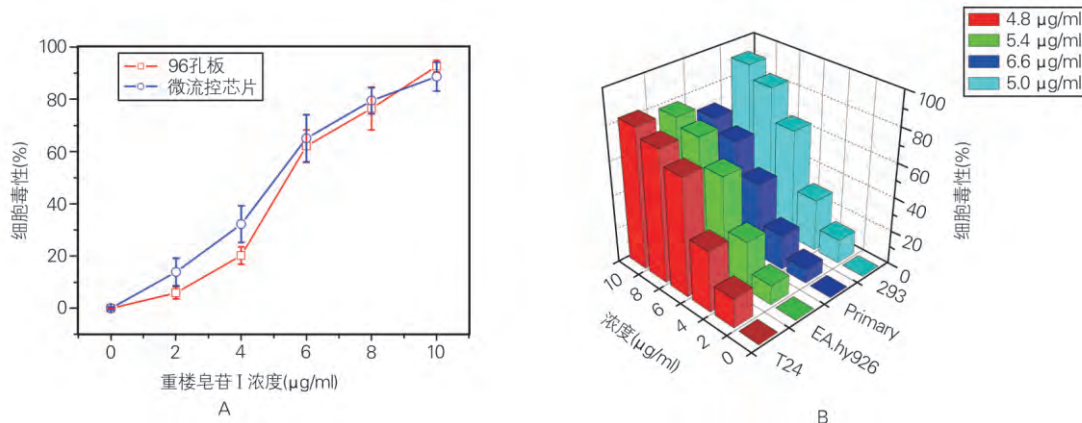


图 7 微流控芯片细胞毒性分析

A. 微流控芯片与传统 96 孔平台测量的重楼皂苷 I 浓度与 A549 细胞毒性关系曲线; B. 微流控芯片上分析重楼皂苷 I 对不同细胞的细胞毒性

3 结论

本文建立了一套简单、易于在普通生物医学实验室开展微流控芯片细胞分析的技术方法,通过重楼皂苷 I 促人肺癌细胞 A549 凋亡为例对本方法进行验证。相比于文献报道的具有多模块集成先进微流控细胞分析应用,本文报道的微流控芯片技术更多的是从普通生物学实验室实际应用出发,具有操作简单、成本低、实验易于重复,且无需昂贵的专用设备等优点。具体来讲,微流控芯片采用了一种感

光干膜的软光刻技术,该法用感光干膜替代液态光刻胶用于制备微流控芯片阳模,不但降低了加工难度和成本,还降低了加工对实验设备和环境的要求;微流控芯片上细胞培养采用了一种间歇式细胞动态培养技术,该技术能为空间受限微通道内的细胞培养提供足够营养物质,且易于操作;微流控芯片上细胞对重楼皂苷 I 的响应分析采用了形态学、细胞存活/死亡荧光染色分析及基于 LDH 释放的细胞毒性分析 3 种策略,能从定性到定量的不同层次获得细胞响应信息。同时,采用不同的细胞分析方法,该技

术还可拓展应用于细胞增殖、迁移及蛋白表达分析。综上所述,本文建立的微流控芯片细胞分析技术方法操作简单,未来可在普通生物医学实验室中推广并应用于各类体外细胞学分析。

【参考文献】

- [1] El-Ali J, Sorger PK, Jensen KF. Cells on chips [J]. *Nature*, 2006, 442(7101): 403 - 411.
- [2] 马超, 申少斐, 赵磊, 等. 生命分析微流控芯片的多尺度应用: 从分子水平到个体水平 [J]. *分析测试学报*, 2015, 34(3): 246 - 256.
- [3] Chung BG, Flanagan LA, Rhee SW, *et al.* Human neural stem cell growth and differentiation in a gradient-generating microfluidic device [J]. *Lab Chip*, 2005, 5(4): 401 - 406.
- [4] Kim BJ, Wu M. Microfluidics for mammalian cell chemotaxis [J]. *Ann Biomed Eng*, 2012, 40(6): 1316 - 1327.
- [5] Nie FQ, Yamada M, Kobayashi J, *et al.* On-chip cell migration assay using microfluidic channels [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(27): 4017 - 4022.
- [6] Wu MH, Huang SB, Lee GB. Microfluidic cell culture systems for drug research [J]. *Lab Chip*, 2010, 10(8): 939 - 956.
- [7] Xu XX, Jiang HR, Li HB, *et al.* Apoptosis of stomach cancer cell SGC-7901 and regulation of Akt signaling way induced by bovine lactoferrin [J]. *J Dairy Sci*, 2010, 93(6): 2344 - 2350.
- [8] Islam A, Rodrigues BL, Marzano IM, *et al.* Cytotoxicity and apoptotic activity of novel organobismuth(V) and organoantimony(V) complexes in different cancer cell lines [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 109: 254 - 267.
- [9] Valero A, Merino F, Wolbers F, *et al.* Apoptotic cell death dynamics of HL60 cells studied using a microfluidic cell trap device [J]. *Lab Chip*, 2005, 5(1): 49 - 55.
- [10] Yang M, Li CW, Yang J. Cell docking and on-chip monitoring of cellular reactions with a controlled concentration gradient on a microfluidic device [J]. *Anal Chem*, 2002, 74(16): 3991 - 4001.
- [11] Chang CW, Peng CC, Liao WH, *et al.* Polydimethylsiloxane SlipChip for mammalian cell culture applications [J]. *Analyst*, 2015, 140(21): 7355 - 7365.
- [12] Jo MC, Liu W, Gu L, *et al.* High-throughput analysis of yeast replicative aging using a microfluidic system [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(30): 9364 - 9369.
- [13] 郑允焕, 吴建璋, 邵建波, 等. 用于药物筛选的微流控细胞阵列芯片 [J]. *生物工程学报*, 2009, 25(5): 779 - 785.
- [14] Ye N, Qin J, Shi W, *et al.* Cell-based high content screening using an integrated microfluidic device [J]. *Lab Chip*, 2007, 7(12): 1696 - 1704.
- [15] Tamaki E, Sato K, Tokeshi M, *et al.* Single-cell analysis by a scanning thermal lens microscope with a microchip: direct monitoring of cytochrome c distribution during apoptosis process [J]. *Anal Chem*, 2002, 74(7): 1560 - 1564.
- [16] Wolbers F, ter Braak P, Le Gac S, *et al.* Viability study of HL60 cells in contact with commonly used microchip materials [J]. *Electrophoresis*, 2006, 27(24): 5073 - 5080.
- [17] Yu JQ, Liu XF, Chin LK, *et al.* Study of endothelial cell apoptosis using fluorescence resonance energy transfer (FRET) biosensor cell line with hemodynamic microfluidic chip system [J]. *Lab Chip*, 2013, 13(14): 2693 - 2700.
- [18] Dai W, Zheng Y, Luo KQ, *et al.* A prototypic microfluidic platform generating stepwise concentration gradients for real-time study of cell apoptosis [J]. *Biomicrofluidics*, 2010, 4(2): 024101 - 024104.
- [19] Antoine C, Ameye L, Paesmans M, *et al.* Systematic review about breast cancer incidence in relation to hormone replacement therapy use [J]. *Climacteric*, 2014, 17(2): 116 - 132.
- [20] 李文娟, 徐溢, 范琪, 等. 基于微流控芯片技术的天然产物活性成分筛选的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(16): 2492 - 2497.
- [21] 王乙同, 马立东, 孟宪生, 等. 基于微流控芯片技术研究水红花子复方抗肿瘤的作用 [J]. *中国现代中药*, 2014, 16(2): 100 - 105.
- [22] Li X, Xue X, Li PC. Real-time detection of the early event of cytotoxicity of herbal ingredients on single leukemia cells studied in a microfluidic biochip [J]. *Integr Biol*, 2009, 1(1): 90 - 98.
- [23] Xiao X, Bai P, Bui Nguyen TM, *et al.* The antitumoral effect of paris saponin I associated with the induction of apoptosis through the mitochondrial pathway [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(5): 1179 - 1188.
- [24] Vulto P, Glade N, Altomare L, *et al.* Microfluidic channel fabrication in dry film resist for production and prototyping of hybrid chips [J]. *Lab Chip*, 2005, 5(2): 158 - 162.
- [25] Stephan K, Pittet P, Renaud L, *et al.* Fast prototyping using a dry film photoresist: microfabrication of soft-lithography masters for microfluidic structures [J]. *J Micromech Microeng*, 2007, 17(10): N69 - N74.
- [26] Xia Y, Whitesides GM. Soft lithography [J]. *Ann Rev Materials Sci*, 1998, 28(1): 153 - 184.
- [27] 徐春秀, 殷学锋. 微流控芯片中细胞动态胞吞二氧化硅纳米颗粒的研究 [J]. *高等学校化学学报*, 2010, 31(9): 1712 - 1716.
- [28] Zhao L, Wang Z, Fan S, *et al.* Chemotherapy resistance research of lung cancer based on micro-fluidic chip system with flow medium [J]. *Biomed Microdevice*, 2010, 12(2): 325 - 332.
- [29] Mehling M, Tay S. Microfluidic cell culture [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 25: 95 - 102.
- [30] Liu WM, Sun P, Yang LY, *et al.* Assay of glioma cell responses to an anticancer drug in a cell based microfluidic device [J]. *Microfluid Nanofluid*, 2010, 9(4): 717 - 725.
- [31] 朱燕, 谢丽, 杨觅, 等. 重楼抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. *癌症进展*, 2015, 13(2): 164 - 166.

(单文戈 编辑 2016 - 01 - 20 收稿)