

一种细胞培养微芯片的制作及应用

邵建波^{1,2}, 吴蕾¹, 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: 细胞培养是细胞研究的基础, 微系统技术的发展给细胞培养提供了新的方法。在微系统平台上进行细胞研究, 能够充分利用微流体和微结构的性质, 对细胞进行操控, 在细胞生物学、组织工程学、药物筛选等领域有广泛应用。文中介绍了一种利用 SU-8 负性光刻胶模具制作双层细胞培养微芯片的方法, 该芯片通过狭缝将细胞培养区和微通道区隔离, 既保证细胞培养区域的相对独立, 又可以利用微流体的特性调节细胞外基质的性质, 给基于微芯片进行细胞研究提供了一种新的平台。

关键词: 细胞培养, 微芯片, 双层 SU-8, 微缝隙

Fabrication and Application of a Novel Cell Culture Microchip

Jianbo Shao^{1,2}, Lei Wu¹, Qinghui Jin¹, and Jianlong Zhao¹

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

2 Graduate School of the Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China

Abstract: In this article, a cell culture microchip was fabricated on the SU-8 mold based on polymer-MEMS process. In the microchip, the cell culture area was separated with microchannel by a microgap, which kept the cell culture area independent, but also regulated the micro-environment of extracellular matrix by the microfluidic flow. The cell culture microchip provided a new platform for cell research.

Keywords: cell culture, microchip, double-layer SU-8, microgap

微系统技术从上世纪 90 年代诞生至今, 由于其分析速度快、试剂消耗少、便于集成和高通量分析等诸多优点, 在生化分析等领域逐步得到应用, 已经成为目前研究热点和前沿。细胞的体外培养技术是进行细胞研究不可替代的实验方法, 近年来, 有报道将微系统技术应用于细胞研究^[1], 给细胞研究提供了新的方法和平台。基于微系统技术的细胞研

究已经在细胞生物学^[2]、组织工程学^[3]、药物筛选^[4]以及生物传感器研究^[5]等方面逐步得到应用。

流体芯片平台应用于细胞研究有很多独特优势, 得到广泛进展。细胞在微芯片内生长改变了常规细胞培养方法, 能够更好的控制和反映细胞受到细胞外基质以及细胞相互之间的调制作用, 实现了一种更接近体内的培养方法。微流体芯片可通过集成在

Received: November 22, 2007; **Accepted:** March 11, 2008

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No.30771115), Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (Nos. 0652nm016, 06JC4081 and 0752nm021), the National Basic Research Program of China(No. 2005CB724305).

Corresponding author: Qinghui Jin. Tel: +86-21-62511070-8706; Fax: +86-21-62511070-8706; E-mail: jinqh@mail.sim.ac.cn

Jianlong Zhao. E-mail: jlzhao@mail.sim.ac.cn

国家自然科学基金项目(No. 30771115), 上海市科委项目(Nos. 0652nm016 and 06JC14081 和 0752nm021)和国家 973 计划项目 (No. 2005CB724305) 资助。

细胞培养腔体内的微结构阵列^[6]或者是利用微流体系层流性质形成的细胞凝胶结构^[7]等方法可实现细胞的立体培养,建立细胞研究的基础平台,结合芯片内微流体形成的化学物质的浓度梯度,精细控制细胞外基质,建立浓度依赖的分析方法^[8,9],实现细胞响应的高通量检测;微流体产生的剪切力施加于细胞,可模拟其在体内环境的受力情况,可使细胞的活性较常规培养有很大提高^[10],为利用微芯片进行组织研究奠定良好基础。微流体器件集成性能优良,在细胞培养芯片内可以集成微阀^[11]等器件,实现培养基以及刺激液的自动进样,可以建立细胞分析的自动化平台。因此,细胞微系统平台已经成为目前细胞生物学领域和微流体芯片领域的热点研究方向。

本文将微流体技术与细胞培养技术相结合,介绍了一种基于微系统平台控制细胞分布进行细胞培养的方法,该微系统芯片不需要借助于凝胶等介质以及对微流体流速的精确控制,只利用微通道之间的狭缝,能够有效的控制细胞的分布区域,实现培养区域的相对独立,而小分子的培养基和药物成分可以自由流动通过,实现了长时间的细胞培养。同时在该平台上可以对细胞状态进行实时观测,为药物筛选等提供了一个全新的细胞培养和筛选平台。

1 实验方法

1.1 芯片制作

本实验中制作如图 1(a)所示的细胞培养微芯片,其中 b 孔为细胞悬浊液进样孔,细胞培养通道的宽度为 $100\ \mu\text{m}$, a 孔和 c 孔为培养基或者刺激液进样孔,其管道宽度为 $200\ \mu\text{m}$,该芯片的主要特点是如图 1(b)所示的粗黑线处的通道高度仅为 $5\ \mu\text{m}$ 的狭缝,该狭缝既可保证细胞培养区与微管道区的连通,又可以使这两个区域相对独立,保证细胞在固定的区域生长,而培养基和刺激液等小分子可以自由流通。该细胞培养微芯片制作的基本方法是先通过微加工技术在硅片表面制作出双层的 SU-8 负性光刻胶模具,然后通过模塑方法形成具有微结构的 PDMS 基片,最后与玻璃键合形成封闭的通道网络,用于细胞的培养和研究,其制作的工艺流程图如图 2 所示。芯片制作的关键工艺是通过制作双层的 SU-8 负性光刻胶模具形成狭缝,下面详细介绍芯片制作的工艺过程。

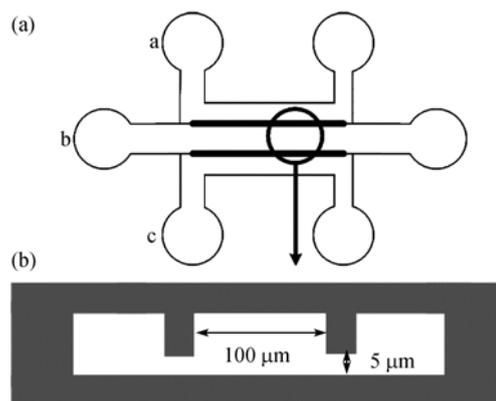


图 1 芯片的结构示意图

Fig. 1 Schematic map of the chip

(a) Structures of the chip; (b) diagram of the cross-sectional view of the microchannel

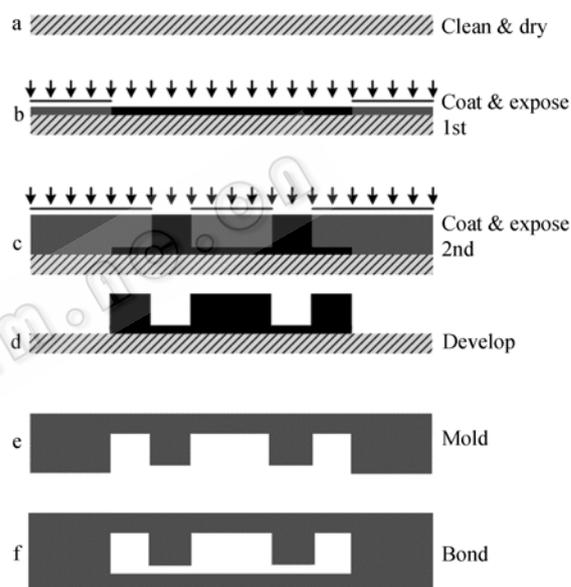


图 2 芯片制作流程示意图

Fig. 2 Schematic illustration of procedure to fabricate the chip

首先是利用 SU-8 负性光刻胶进行“多次光刻、一次显影”^[12]工艺制作双层的细胞芯片模具。将硅片在 Piranha 洗液(硫酸和双氧水按 5:1 混合)中煮沸 10 min,冷却后用去离子水冲洗干净,氮气吹干后在 200°C 烘箱中烘 30 min。在清洗干净并烘干的硅片上甩涂稀释的负性光刻胶 SU8-2025(MicroChem Corp., MA, USA),放在热板上在 65°C 烘 1 min 然后升温至 95°C 保持 2 min,缓慢降温至室温。在光刻机中将第一层掩模版与硅片对准,曝光,然后对基片进行 PEB(Post exposed bake, PEB),即在热板上 65°C 烘 1 min 然后升温到 95°C 保持 1 min,缓慢降

温至室温, 这样就将第一层的图形转移到 SU-8 光刻胶上。再将第二层 SU8-2025 甩涂于基片表面, 在热板上加热到 65°C 保持 1 min 然后加热到 95°C 保持 3 min 冷却至室温完成前烘, 对准第二层掩模曝光, 将硅片放到热板上加热到 65°C 保持 1 min 然后升温至 95°C 保持 3 min 完成 PEB, 缓慢冷却至室温, 最后超声辅助显影, 形成双层的 SU-8 模具。

将 PDMS(Dow Corning, Michigan, USA)单体与固化剂按照 10:1 的比例混合均匀后, 抽真空后进行脱气处理, 浇注在有 SU-8 微结构的硅片上, 放置在 80°C 的热板上固化 1 h, 冷却后从硅片表面剥离, 打孔, 并切割成合适的大小备用。

将制备好的具有微结构的 PDMS 和清洗干净的玻璃片或无结构的 PDMS 基片放入氧离子表面处理机中对其表面处理 15 s, 取出后将二者迅速贴合, 形成封闭的微通道网络, 完成细胞培养微芯片的制作。

1.2 微芯片内细胞培养

注入芯片内培养的细胞采用实验室常规培养的 3T3 细胞和 B-Cap 细胞(上海市第九人民医院组织工程中心)。细胞培养液为 DMEM(Gibco), 加入 10% 的胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)和 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的链霉素(吉诺生物医药技术有限公司, 杭州), 消化液为 0.25% 的胰酶和 0.02% 的 EDTA(吉诺生物医药技术有限公司, 杭州)。

将制作好的细胞培养微芯片用 75% 的酒精浸润, 然后放入常规细胞培养皿(Polystyrene Petri dish)中, 用紫外线照射 1 h, 进行消毒。为利于细胞在微通道内贴壁生长, 在微通道内导入细胞培养液浸润过夜, 使芯片表面包被蛋白。将生长状态良好的细胞进行消化, 吹散打匀, 通过进液孔导入芯片内, 放入培养箱内进行培养。培养过程中每隔一天更换芯片内部的培养液。培养箱外培养时, 将导入细胞的芯片放在 ITO 玻璃加热平台上, 同时在培养基内添加与 DMEM 等量的 Leibovitz's L-15(Gibco)以保证细胞外基质的酸碱度稳定^[13], 并且每 12 h 补充一次培养液, 以保证培养基的稳定。

1.3 细胞活性检测

芯片内贴壁生长的细胞活性通过 Live/dead viability/cytotoxicity kit 试剂盒(Molecular probes)进行检测。细胞在芯片内生长 72 h 后, 先通入 PBS 清洗 5 min, 再通入含 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Calcein AM 和 4 $\mu\text{mol}/\text{L}$

Ethidium homodier-1(EthD-1)的混合液在室温下孵育 30 min, 然后立即在荧光显微镜(Olympus)下观察并拍照。

2 结果与讨论

2.1 材料选择

制作细胞芯片的材料可以是硅、玻璃、PDMS 等生物兼容性材料。硅材料虽然具有良好的微加工性能, 但是由于透光性不好, 不便于观察细胞的形态, 因此硅材料多用于刻蚀或者是在其表面用负胶加工制作模具, 用于模塑的方法形成细胞培养芯片。玻璃不仅具有良好的微加工性能, 还具有很好的透光性和生物兼容性, 被广泛的用于细胞芯片的制作, 但是由于其不透气性, 因此采用全玻璃材料制作细胞芯片时需要在培养液中溶入足够的氧气, 并且频繁更换培养液或者是采用灌注的方法才能保证细胞的生长。PDMS 是目前微加工技术中广泛应用的一种材料, 由于其可以通过模具批量加工, 生产成本低, 且 PDMS 具有很好的透光性、生物兼容性和透气性^[14], 是制作细胞培养微芯片的优良材料。

本实验中通过 PDMS 与玻璃键合制作细胞培养微芯片, 既有良好的生物兼容性, 又便于实验过程中的观察, 还因为材料优良的透气性特点, 可以满足细胞生长过程中对气体氛围的要求, 更有利于细胞的在片培养和实时观测。

2.2 SU-8 双层模具的制作

目前, 基于 SU-8 负性光刻胶加工模具的技术得到广泛应用。实验中使用的细胞培养微芯片的模具是将双层结构做到一片硅片上, 采用“两次曝光, 一次显影”方法制作的 SU-8 负性光刻胶模具, 可以简化模具的制作工艺流程, 避免模塑成型后繁琐的结构对准步骤进行键合, 提高芯片的制作效率和成品率。

2.3 可变式的芯片结构

将进样孔打在有微结构的基片上和在没有微结构的基片上, 芯片内的微缝的位置会不同。如图 3(a)所示, 若将液体进样孔开在具有微结构图形的基片上, 然后与没有微结构的基片键合, 则微缝在芯片底部; 如图 3(b)所示, 若将液体进样孔开在没有微结构图形的基片上, 然后与具有微结构的基片键合, 则微缝在芯片的顶部。这样通过一个模具基片可以

制作出两种特点不同的细胞培养微芯片,可以根据实验的需要选择适当的结构。当微缝在芯片底部时,可以保证液体流动区的液体对细胞的直接刺激;当微缝在芯片顶部的时候,可以有效地隔离液体流动区对于细胞培养区细胞产生的剪切力等的影响,通过微流体的扩散作用对细胞提供养分和进行研究。最后制成的芯片如图 4(a)所示, 4(b)和 4(c)为管道微结构的显微镜的图片,可以清楚地看到中间的细胞培养区域和两侧的微流体区域有微小的狭缝相通。

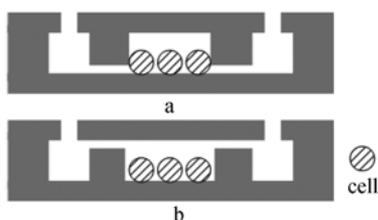


图 3 两种芯片结构示意图
Fig. 3 Schematic maps of two different chips



图 4 芯片图

Fig. 4 Views of the chip

(a) the microdevices; (b) structure of the microchannel; (c) cross-sectional view of the microchannel

2.4 细胞的固定、在片培养与检测

为了实现细胞在固定区域的培养,芯片内细胞培养区域与周围的微通道区域之间连通的狭缝的高度为 5 μm ,而细胞的直径约为 10~20 μm ,因此,细胞悬浊液从细胞培养区的进样孔导入芯片后,通过狭缝的拦截及微流体的流动使细胞只分布在细胞培

养区域,有效的控制细胞的分布区域。图 5(a)为 3T3 细胞刚导入后芯片内在微缝处的分布图,可见狭缝对细胞有很好的拦截作用;图 5(b)为 3T3 细胞在培养区域内贴壁生长的状态,说明细胞在该芯片内生长状态良好。图 5(c)和 5(d)为细胞活性检测试剂盒对 72 h 后芯片内同一区域内的 B-Cap 细胞进行荧光染色的照片,由于 calcein AM 亲脂性很高,能够穿透细胞膜脱去 AM 基,使活细胞发出绿色荧光(如图 5(c)所示),而 EthD-1 不能穿透细胞膜,因此只能使死细胞激发红色荧光(如图 5(d)所示)。芯片内绝大部分细胞呈现绿色荧光,只有少量红色细胞,表明细胞在该芯片内有很高的成活率,适宜进行细胞培养和实验。

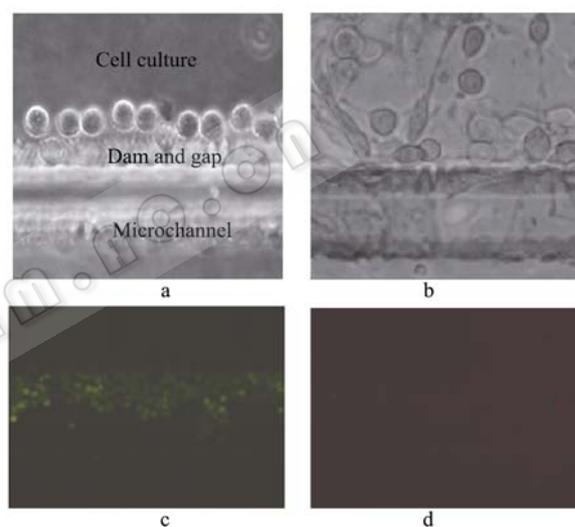


图 5 细胞在芯片内的图片

Fig. 5 Cells in the chip

(a) cells lay besides the dam after infused; (b) cells growth in the chip; (c) staining with Calcein AM; (d) staining with EthD-1

2.5 培养箱外细胞培养和实时观测

细胞状态的实时观测是细胞研究的需要。脱离了培养箱的培养,由于无法满足温度以及酸碱度的条件,因此调整这些因素以保证细胞能够正常生长。因此,实验中通过添加 Leibovitz's L-15 以保证细胞外基质的酸碱度稳定;利用实验室自制的 ITO 玻璃加热平台上进行培养^[15],保证细胞生活所需要的温度条件;以及每 12 h 补充一次培养液或灌注的方法,保证培养基的稳定。通过以上三个条件的优化,该微芯片成功的应用于培养箱外细胞培养,图 6 为 3T3 细胞在箱外培养 2 d 的图片,细胞仍保持良好状态。

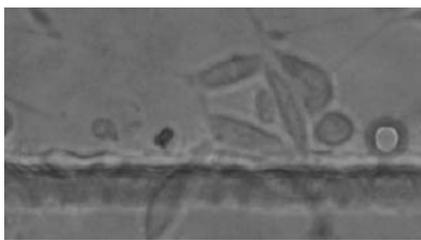


图 6 3T3 细胞在培养箱外培养 2 d 的照片

Fig. 6 3T3 cells cultured outside the incubator after 2 days

3 小结

采用“两次光刻, 一次显影”技术制作 SU-8 负性光刻胶模具, 浇注 PDMS, 固化成形和键合工艺制作的具有狭缝的微系统芯片, 能够有效控制细胞在芯片内的分布, 实现细胞在微芯片内长时间培养, 并且可以根据狭缝的位置不同设计不同的芯片结构, 满足多种实验要求。同时该芯片可在培养箱外进行细胞培养, 能够保持细胞的活性, 进行细胞状态的实时监测。该芯片将微流体技术和细胞培养技术有机结合, 为基于微系统技术进行细胞研究提供了一种新的研究平台。

REFERENCES

- [1] El-Ali J, Sorger PK, Jensen KF. Cells on chips. *Nature*, 2006, **442**(7101): 403–411.
- [2] Chen CS, Mrksich M, Huang S, *et al.* Geometric control of cell life and death. *Science*, 1997, **276**: 1425–1428.
- [3] Andersson H, Berg AWD. Microfabrication and microfluidics for tissue engineering: state of the art and future opportunities. *Lab Chip*, 2004, **4**(2): 98–103.
- [4] Viravaidya K, Sin A, Shuler ML. Development of a microscale cell culture analog to probe naphthalene toxicity. *Biotechnol Prog*, 2004, **20**: 316–323.
- [5] Yang MS, Li CW, Yang J. Cell docking and on-chip monitoring of cellular reactions with a controlled concentration gradient on a microfluidic device. *Anal Chem*, 2002, **74**: 3991–4001.
- [6] Toh YC, Zhang C, Zhang J, *et al.* A novel 3D mammalian cell perfusion-culture system in microfluidic channels. *Lab Chip*, 2007, **7**: 302–309.
- [7] Kim MS, Yeon JH, Park JK. A microfluidic platform for 3-dimensional cell culture and cell-based assays. *Biomed Microdevices*, 2007, **9**: 25–34.
- [8] Hirokazu K, Matsuhiko N, Tomokazu M. Localized chemical stimulation to micropatterned cells using multiple laminar fluid flows. *Lab Chip*, 2003, **3**(3): 208–211.
- [9] Lau AY, Hung PJ, Wu AR, *et al.* Open-access microfluidic patch-clamp array with raised lateral cell trapping sites. *Lab Chip*, 2006, **6**: 1510–1515.
- [10] Leclerc E, David B, Griscom L, *et al.* Study of osteoblastic cells in a microfluidic environment. *Biomaterials*, 2006, **27**: 586–595.
- [11] Huang CW, Lee GB. A microfluidic system for automatic cell culture. *J Micromech. Microeng*, 2007, **17**: 1266–1274.
- [12] Xu BJ, Jin QH, Zhao JL. Fabrication and application of multilayer SU-8 based micro dispensing array chip. *Journal of functional materials and devices*, 2006, **12**(5): 377–382.
- [13] 许宝建, 金庆辉, 赵建龙. 基于多层 SU-8 结构的微喷射阵列芯片的制作与应用研究. *功能材料与器件学报*, 2006, **12**(5): 377–382.
- [14] Fu N, Gu W. Handheld recirculation system and customized media for microfluidic cell culture. *Lab Chip*, 2006, **6**(1): 149–154.
- [15] Eric L, Yasuyuki S, Teruo F. Cell culture in 3-Dimensional microfluidic structure of PDMS (polydimethylsiloxane). *Biomedical Microdevices*, 2003, **5**(2): 109–114.
- [16] Yang CB, Zhao JL. Chip Temperature Control System Based on 812. *Control & Automation*, 2007, **9**(1): 43–44.
- [17] 杨才表, 赵建龙. 基于 812 的芯片温度控制系统的研究. *微计算机信息*, 2007, **9**(1): 43–44.