

3D 打印微流控浓度梯度芯片和纸芯片联合系统的开发及应用

刘萍, 李博伟, 周娜, 吴学丽

(中国科学院 烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003)

摘要: 将 3D (three-dimensional) 打印微流控芯片和纸芯片联合, 研制了一套细胞样品处理装置。3D 打印芯片分为上下两层, 上层是浓度梯度形成层, 下层是带有生长室的细胞培养层, 生物相容性高的纸芯片置于生长室中作为细胞培养和分析的基底。该装置能对细胞进行连续稳定的浓度梯度待测物刺激, 能够模拟细胞体内三维生长方式, 细胞分析时所需试剂量少 (3-5 μ L), 能大大降低实验成本。该装置在基于细胞的药物筛选, 药理、毒理学研究中有较好的应用前景。

关键词: 微流控芯片;3D 打印;纸芯片;细胞

Development and application of 3D printing microfluidic concentration gradient chip and paper chip

Liu Ping, Li Bowei, Zhou Na, Wu Xueli

(Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China)

Abstract: A cell processing device was developed by combining 3D printed microfluidic chip with paper-based chip. The 3D printed chip included two layers, the upper layer was for forming concentration gradient, and the bottom layer was for cell culture. The paper-based chips with high biocompatibility were placed in the growth chambers of the bottom layer as the substrate for cell culture and analysis. The device could stimulate the cells with a continuous and stable concentration gradient. Cells could grow in three dimensions in this device, and the cells could be analyzed with very little fluid (3-5 μ L). It is expected that this novel hybrid 3D-printed and paper-based microfluidic device will have widespread application prospects in cell investigation.

Keywords: microfluidic chip, 3D-printed devices, paper-based microfluidic chip, cell

1 引言

传统的基于细胞的化合物活性检测通常在多孔细胞培养板中进行。配置和分配不同浓度

化合物或刺激物的操作比较繁杂，不能模拟体内环境浓度，其次，多孔板中的暴露溶液是相对静止的，造成细胞的代谢物不能及时自动排除；更为重要的是，多孔板是开放的体系^[1]，由于液体的挥发及非选择性吸收，导致不可控的溶液浓度变化^[2]，给实验带来不确定性。

3D 打印微流控芯片技术即用 3D 打印技术直接打印制作微流控芯片。传统的 PDMS 微流控芯片的制作包括：模具制作，PDMS 基片制作，等离子键合这三大步骤，每个大步骤中又包含多个小步骤，制作过程繁琐^[4-6]，而 3D 打印只需在设计完成后直接打印出微流控芯片即可，可以显著简化微流控芯片的加工过程，极大降低微流控芯片的加工成本，对微流控芯片技术的推广应用有着非常积极的意义。

纸芯片技术是微流控芯片领域的最新发展方向，使用纤维素材料（例如：纸、纤维膜、聚合物薄膜）作为基底，在纸的表面加工出具备一定流体通路的分析器件。纸具有通透性良好、生物兼容性好的优点，还便于调节厚度、大小及表面性质，易于修饰和操作^[7-10]。另外，纸来源丰富、价格低廉，可批量生产，非常适用于一次性分析，纸的主要成分为纤维素，流体可在纸的表面通过毛细作用力流动，可有效减少试剂消耗量，从而降低检测背景。

本项目设计带有浓度梯度形成器的微流控芯片，利用 3D 打印技术制作微流控芯片，以纸芯片作为细胞培养和分析的载体，制作了一套细胞分析装置，能对细胞进行连续稳定的浓度梯度待测物刺激。3D 打印技术能一步制作微流控芯片，简单、方便，并且 3D 打印芯片能够重复利用，每次实验只需更换纸芯片；制作的 3D 打印微流控芯片能够自动产生浓度梯度，省去了配置和分配不同浓度化合物或刺激物的繁杂操作；纸芯片上的细胞分析时，所需的抗体或染色液量少（小于 5 μL ），能大大降低实验成本；该系统能够有效模拟细胞体内生长环境，细胞在纸芯片上三维立体生长，细胞的代谢产物能够随着液流自动排出培养体系。由于以上优点，该系统在基于细胞的海洋药物筛选，海洋生态毒理学研究中有广泛的应用前景。

2 系统总体设计

3D 打印微流控芯片包括上下两层，上层为液流层，带有“圣诞树”结构浓度梯度形成管道网络，当不同浓度的两股液体从入口注入，经圣诞树结构能自动形成浓度梯度，下层板中带有 5 个方形凹槽为细胞培养室。细胞种植在纸芯片上后，将带有细胞的纸芯片分别放入下层凹槽中，将 3D 打印芯片的上、下层组合起来，并用螺丝固定，恒流注射泵以相同的流速向 3D 打印芯片内注入液体，上层形成的浓度梯度液体能连续滴加到下层纸芯片上，对细胞进行连续的刺激，细胞的代谢产物能够随着液流自动排出培养体系。

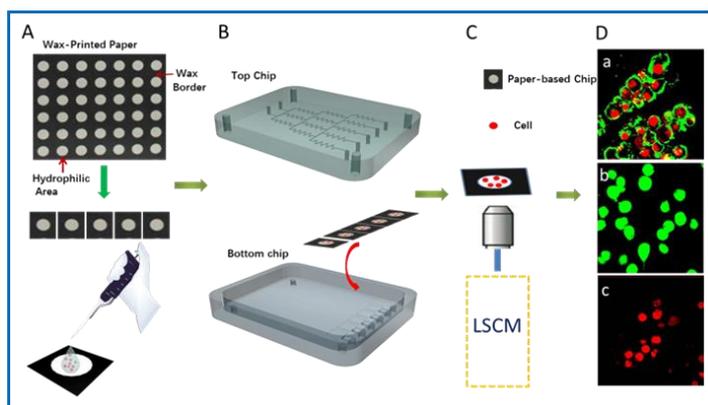


图1 微流控浓度梯度形成系统和纸芯片联合平台整体工作示意图

A: 喷墨打印纸芯片及芯片上细胞种植; B: 纸芯片放入 3D 打印微流控芯片; C: 纸芯片上细胞的激光扫描共聚焦显微镜观察; D: 纸芯片上细胞的荧光成像。

2.1 微流控浓度梯度形成芯片的设计制作

微流控芯片用 123D 软件设计，包括上下两层板，上层板的尺寸是 90 mm × 70 mm，下层板的尺寸是 100 mm × 80 mm，产生浓度梯度的经典“圣诞树”微流控网络嵌入到上层板中，其管道的尺寸为直径 1.0 mm。微流控液流入口的孔径是 1.8 mm。底层板上有 5 个方形的凹槽，长和宽是 8 mm，深 4 mm，每个凹槽连着宽 4 mm，深为 2.5 mm 的管道作为废液流出管，管路的流出口直径为 4 mm；上下两层都带有螺丝孔，能将两层牢固地结合在一起，详细信息如图 2 所示。以透明树脂为材料用 3D 打印机打印出设计好的芯片，图 3 为微流控芯片的成品实物图及与纸芯片联用组装好的芯片实物图。“圣诞树”网络结构基于通道内层流和扩散混合效应产生浓度梯度，根据文献中“圣诞树结构”形成浓度的计算公式（Anal. Chem. 2001, 73, 1240-1246），当“圣诞树”结构有两个液流入口，5 个分支出口，一个入口加入空白培养基，另一个入口加入浓度为 C 的化学物质培养基时，5 个出口培养基中化学物质的浓度分别为：0、 $1/4 C$ 、 $2/4 C$ 、 $3/4 C$ 、C。

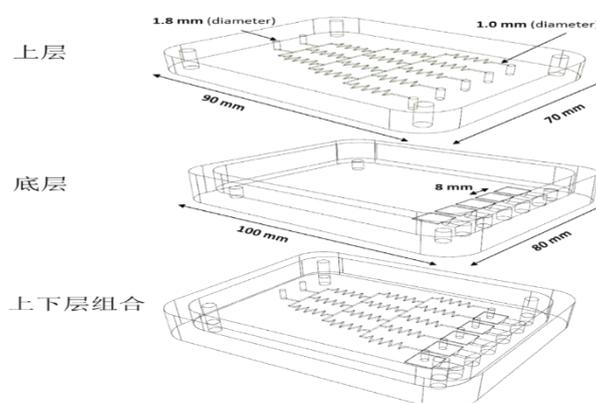


图2 微流控浓度梯度生成器设计图



图3 微流控芯片浓度梯度生成器实物图

2.2 纸芯片的制作

纸芯片的圆形微孔阵列用 Freehand 软件设计，圆形区域的直径是 5 mm，用 Xerox ColorQube 8870 喷蜡打印机将蜡打印到 Whatman 滤纸上，滤纸的厚度是 180 μm ，打印好的纸于 120 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 40s，让蜡融化并渗透到整层纸中。用剪刀从剪下小反应器，在紫外灯下照射过夜灭菌，然后，另一面再灭菌 4 小时，然后把他们放在无菌的容器中备用。

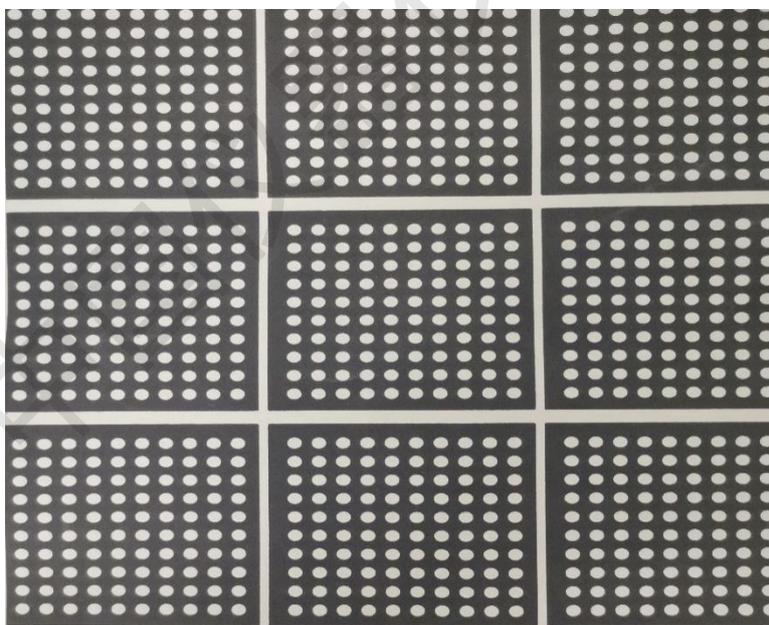


图4 喷蜡打印机打印出的纸芯片

2.3 验证浓度梯度形成芯片的浓度形成效率

我们采用红蓝墨水和荧光试剂 Cy7，验证 3D 打印微流控芯片的浓度梯度形成效率，通过恒流注射泵将红、蓝墨水以相同的流速，同时注入芯片的液流入口，如图 5A, B 所示，两种液体在芯片的圣诞树结构中自动混合，最终形成浓度梯度，由图 5C 可以看出芯片形成

的浓度梯度具有较好的线性， $R^2=0.9825$ ；向芯片中注射 Cy7 溶液及水后对各通道末端进行荧光成像，图 6 A 所示，5 个通道中的荧光强度呈现明显的梯度，由图 6 B 各通道中荧光强度定量分析可以看出芯片形成的浓度梯度具有较好的线性， $R^2=0.985$ ，以上结果显示浓度梯度形成芯片能形成较好的浓度梯度。

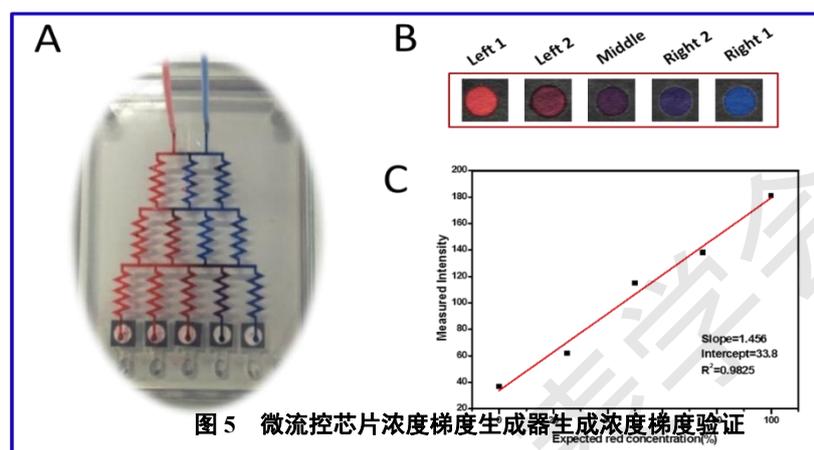


图 5 微流控芯片浓度梯度生成器生成浓度梯度验证

(A) 用红蓝墨水验证浓度梯度形成，红墨水（左），蓝墨水（右）；(B) 流速为 $2.5 \mu\text{L}/\text{min}$ 时形成的液流滴到下游纸芯片上；(C) 当流速为 $2.5 \mu\text{L}/\text{min}$ 时，测得的芯片通道内红色和预期红色值之间的线性关系。

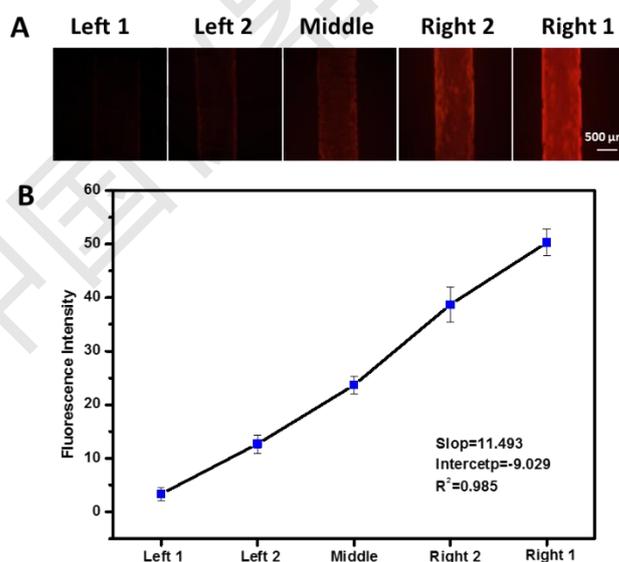


图 6 微流控芯片浓度梯度生成器生成浓度梯度验证

(A) 荧光染料 Cy7、 1mM Cy7（右）和 DI 水（左），流速为 $2.5 \mu\text{L}/\text{min}$ 时，五个通道内的荧光成像；(B) 五个通道中的荧光线性关系

2.4 微流控浓度梯度形成系统和纸芯片联合平台培养细胞

将培养瓶中的细胞消化，离心收集细胞，调整细胞浓度到 5×10^6 个/mL，放在冰上预冷，

取细胞悬液和 Matrigel 1:1 混合，取 2 μ L 混合好的悬液加到冰上预冷的纸芯片亲水区，待细胞悬液分布完全后，加入 37 $^{\circ}$ C 预热的培养基，将纸芯片放入培养箱中 30 min，使 Matrigel 胶凝固。微流控设备、管和玻璃注射器利用蒸汽灭菌并烘干，用恒流注射泵将从流控设备的一个进液口注入含有待测物的培养基，另一个进液口注入培养基，待形成稳定的浓度梯度后，将种有细胞的纸芯片放入微流控设备下部的凹槽内，将微流控设备的上下两层组合并用螺丝固定，恒流泵的流速设定为 2.5 μ L/min。图 7 是微流控浓度梯度形成系统和纸芯片联合平台工作照片，微流控系统放入培养箱中培养特定的时间后，将设备拆开取出纸芯片进行扫描电镜观察或荧光染色分析，如图 8，扫描电镜的结果显示，细胞在微流控浓度梯度形成系统和纸芯片联合平台上培养 12 小时和 72 小时后，细胞呈梭形具有较好的细胞形态；图 9 细胞用活细胞荧光染料染色后，荧光成像的结果显示，纸芯片上的很多细胞有活性，且 72 小时的细胞比 12 小时的细胞数明显增多，说明在纸芯片上随着培养时间增长，细胞逐渐增殖，综合图 8 和图 9 的结果说明微流控浓度梯度形成系统和纸芯片联合平台适合细胞的长时间连续培养。



图 7 微流控芯片浓度梯度形成器和纸芯片联合系统工作实物图

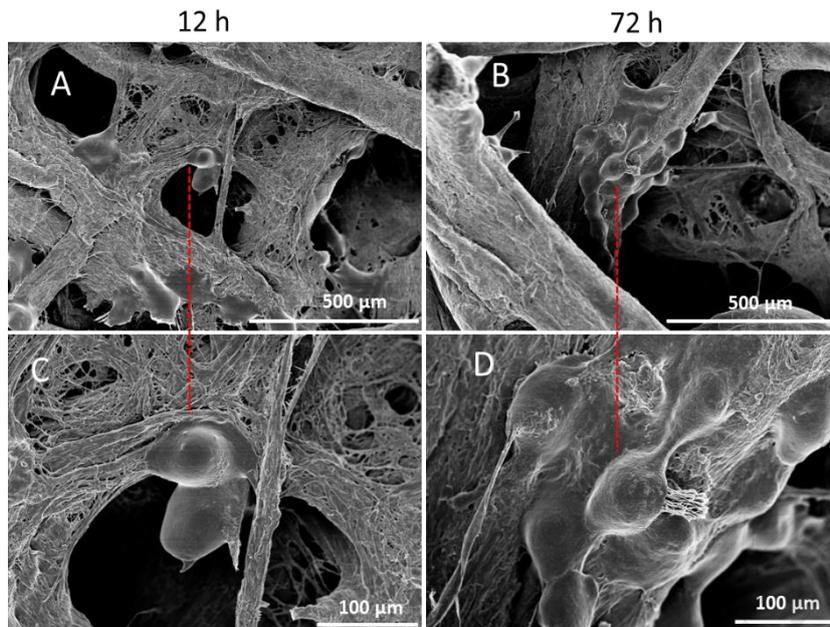


图8 细胞在纸芯片上培养 12 小时 (A) 和 72 小时 (B) 后的扫描电镜结果 (C, D 为对应的 A, B 的放大图)

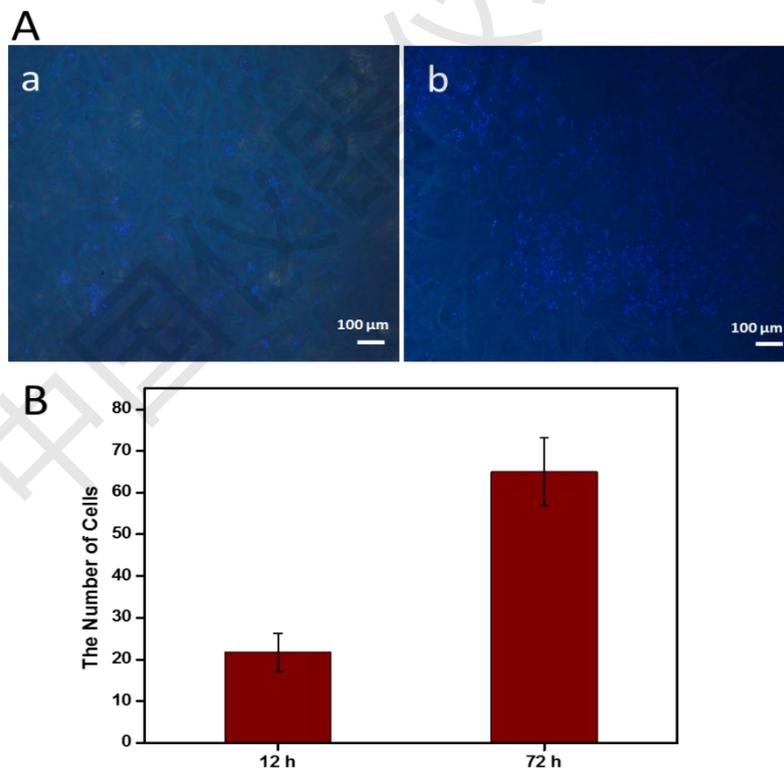


图9 (A) 细胞在纸芯片上培养不同时间后经活细胞染料染色后的荧光成像结果
a: 12 小时; b: 72 小时 (B) 纸芯片上活细胞数目统计

2.5 微流控浓度梯度形成系统和纸芯片联合平台的应用

2.5.1 连续低浓度的 H₂S 对细胞凋亡的影响

硫化氢是一种重要的生理信号分子，在许多生理和病理功能中起着重要的作用。然而对于硫化氢供体（NaHS 和 GYY4137）的促进/抑制细胞生长的功能存在争议，一个重要原因是相关的研究实验都是在微孔板中进行的，而硫化氢是一种气体分子，硫化氢供体释放出的硫化氢气体会很从微孔板中挥发，导致实际检测的硫化氢气体浓度的不稳定性，给实验带来不可靠性。

我们用 Annexin V-FITC 和 PI 两种染料对细胞染色用激光扫描共聚焦显微镜来检测连续低浓度的 H₂S 作用对细胞凋亡的影响，如图 10，结果显示随着 NaHS 剂量的增加，诱导 SMMC-7721 细胞凋亡程度加深。50 和 100 μM NaHS 连续刺激 48 小时的细胞处于早期凋亡状态，而 150 和 200 μM NaHS 处理的细胞已经进入了晚期凋亡状态。结果显示微流控浓度梯度形成系统和纸芯片联合平台能

适合研究化合物尤其是易挥发的化学物的细胞毒性作用，且激光扫描能够检测纸芯片上细胞内的荧光信号。

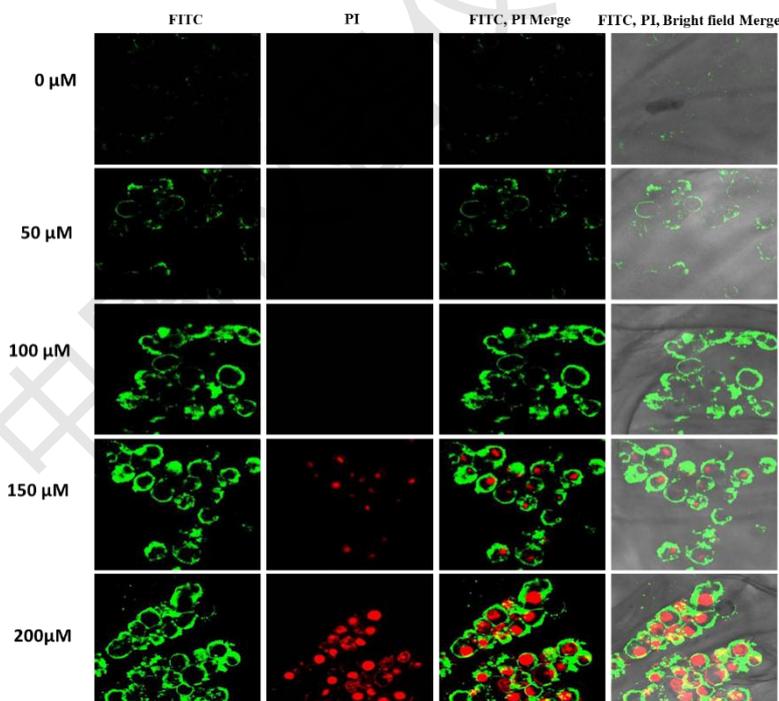


图 10 细胞凋亡 Annexin V-FITC/PI 染色结果

NaHS 在微流控浓度梯度形成系统和纸芯片联合平台上连续作用细胞 48 小时后 Annexin V-FITC/PI 染色后，激光扫描共聚焦显微镜成像。

2.5.2 连续低浓度的 H₂S 对细胞内活性分子的影响

利用硫烷硫的荧光探针，基于激光扫描共聚焦显微镜成像法检测连续低浓度的 H_2S 对细胞内硫烷硫的影响。图 11 所示随着结果显示随着 NaHS 剂量的增加，细胞内的硫烷硫含量增加。

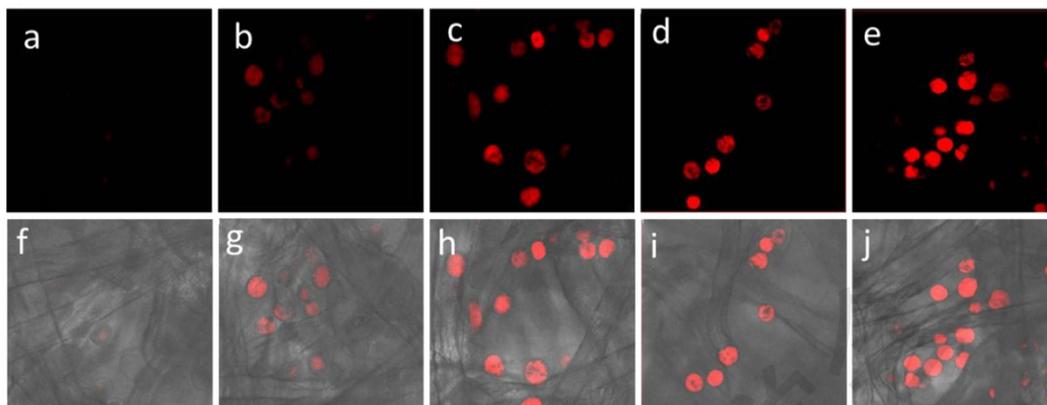


图 11 细胞内硫烷硫荧光成像

细胞连续暴露于不同浓度 NaHS 2 小时后用硫烷硫探针 Mito-SH 染色，(a) 0 μM ; (b) 50 μM ; (c) 100 μM ; (d) 150 μM ; (e) 200 μM ; (f-g) 为 (a-d) 和明场的叠加图。

4 结语

将打印微流控芯片和纸芯片联合，设计制作了一套细胞分析装置。该装置由 3D 打印微流控芯片和纸芯片构成，3D 打印芯片的上层为浓度梯度形成层，下层是带有生长室的细胞培养层，纸芯片置于生长室内作为细胞培养的载体。在注射流速为 $2.5\mu L / \text{min}$ 时 3D 打印微流控芯片能形成较好的浓度梯度；该装置上培养的细胞具有良好的生长活力和细胞形态，细胞在纸芯片上能够三维立体生长；利用该装置能连续对细胞进行浓度梯度物质的刺激，适合基于细胞的化合物相关性质的分析。我们利用构建的 3D 打印微流控浓度梯度芯片和纸芯片复合细胞分析平台研究了连续、低浓度的 H_2S 对肿瘤细胞凋亡以及细胞内活性分子的影响，取得了较好的结果，显示出该装置在细胞分析中的应用潜力。

参考文献：

- [1] YE N N, QIN J H, SHI W W, et al. Cell-based high content screening using an integrated microfluidic device [J]. Lab on a Chip, 2007, 7(12): 1696-704.
- [2] WU G, IRVINE J, LUFT C, et al. Assay development and high-throughput screening of caspases in microfluidic format [J]. Comb Chem High T Scr, 2003, 6(4): 303-12.

- [3] CHUNG S, SUDO R, MACK P J, et al. Cell migration into scaffolds under co-culture conditions in a microfluidic platform [J]. *Lab on a Chip*, 2009, 9(2): 269-75.
- [4] MA B, ZHANG G H, QIN J H, et al. Characterization of drug metabolites and cytotoxicity assay simultaneously using an integrated microfluidic device [J]. *Lab on a Chip*, 2009, 9(2): 232-8.
- [5] BHATTACHARJEE N, URRIOS A, KANGA S, et al. The upcoming 3D-printing revolution in microfluidics [J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(10): 1720-42.
- [6] SIMON K A, MOSADEGH B, MINN K T, et al. Metabolic response of lung cancer cells to radiation in a paper-based 3D cell culture system [J]. *Biomaterials*, 2016, 95: 47-59.
- [7] PARK H J, YU S J, YANG K, et al. Paper-based bioactive scaffolds for stem cell-mediated bone tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(37): 9811-23.
- [8] MOSADEGH B, LOCKETT M R, MINN K T, et al. A paper-based invasion assay: Assessing chemotaxis of cancer cells in gradients of oxygen [J]. *Biomaterials*, 2015, 52: 262-71.
- [9] WANG L, XU C, ZHU Y, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived beating cardiac tissues on paper [J]. *Lab Chip*, 2015, 15(22): 4283-90.
- [10] BAI R H, LI L M, LIU M M, et al. Paper-Based 3D Scaffold for Multiplexed Single Cell Secretomic Analysis [J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(9): 5825-32.