论著

文章编号:1000-5404(2006)22-2256-03

RGD多肽功能化的微流控芯片识别/捕获肿瘤细胞的研究

毕颖楠,张惠静,管 潇,邓 金 (第三军医大学医学检验系分析化学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨经RGD多肽功能化后的微流控芯片系统识别/捕获肿瘤细胞的效果。**方法** 采用化学共价连接的方法固定RGD多肽,建立由流体控制系统、免疫反应系统构成的细胞识别芯片系统,用于细胞的筛选/捕获;选用不同密度的细胞进行进样试验,考察不同细胞密度对通道内细胞数量的影响,并讨论不同的孵育时间对细胞捕获的影响。**结果** 随着进样细胞密度的增加,进入通道内的细胞明显增多;此功能化后的芯片系统在15 min内对A549的捕获率为90%,在20 min内可完全将细胞捕获于管壁。**结论** 经RGD多肽修饰的微流控芯片系统可在短时间内对A549细胞进行有效的筛选,且在细胞数量很低时,也能对其进行捕获。

关键词:生物功能化;微流控芯片;细胞捕获

中图法分类号:R318.04;R392-33;R730.4 **文献标识码**:A

Study on capturing lung cancer cells in microfluidic-chip by RGD bio-functionalization

BI Ying-nan, ZHANG Hui-jing, GUAN Xiao, DENG Jin (Department of Analytic Chemistry, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To evaluate the ability of bio-functionalization microfluidic-chip with RGD peptide to capture lung tumor cells(A549). Methods RGD peptide were through direct covalent linkage attached on micro-channel surface with 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) to A549 cells. Different cell densities and incubation time were employed to calculate the rate of captured cell by counting cells in the whole micro-channel. Results With the increasing sample density, the number of cells enhanced obviously in the micro-channel. As incubation time extended, the capture cells also increased. When the incubation for 15 min, the capture rate was about 90%, while for 20 min was 100%. Conclusion This bio-functionalization microfluidic-chip can capture lung cancer cells in a short time. Even though the density of cells is low, this chip can also capture the cell.

Key words: bio-functionalization; microfluidic-chip; capture cells

微流控芯片的生物功能化是近期发展的新热点[1,2],它利用抗原/抗体、受体/配体的特异性识别,将抗体/配体固定于微通道表面,通过增加芯片的特异性和敏感性来捕捉、筛选靶细胞,同时通过生物化修饰,可提高芯片的生物相容性,利于细胞的生存培养,芯片的构造也相对简单。

A549(人肺腺癌细胞)是人肺非小细胞癌中的一类,其膜上高表达整合素α5β1(CD49e/CD29, VLA-5)[3-5],它作为纤连蛋白的受体可识别结合RGD短肽序列。本研究以RGD短肽与整合素分子的相互识别为理论基础,应用RDG短肽功能化的微流控芯片系统对肺肿瘤细胞(A549)进行筛选/捕捉,以评价经RGD功能化后的微流控芯片的性能,为进一步应用功能化的芯片系统进行细胞学研究作基础性的探索。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

1.1.1 A549细胞株 由新桥医院肿瘤科赠与,本室传代培养。

1.1.2 主要试剂 1640培养基(Hyclone);0.01 mol/L PBS缓冲液;0.1 mol/L PBS缓冲液;RGD多肽(西安华辰);N-烃基磺基琥珀酰亚胺,NHS(Sigma);碳二亚胺盐酸盐,EDC(Sigma);3-氨丙基三乙氧基硅烷,APTES(Sigma);MES缓冲液:0.1 mol/L 2-(N-吗啡啉)乙磺酸,MES(Sigma),0.5 mol/L NaCl, pH 6.0。

1.1.3 主要仪器设备 智能高压电源(山东师范大学);微流控芯片:经RGD多肽功能化修饰的玻璃微流控芯片,通道尺寸:200 μm×100 μm×5 cm。

1.2 微流控芯片的RGD多肽功能化

用HCl、NaOH、去离子水依次清洗芯片微通道,负压抽干。之后将清洗液(H_2SO_4:H_2O_2=3:1)注入微管道内,加热直至微通道内出现气泡,后用去离子水清洗微通道,负压抽干。将

作者简介:毕颖楠(1981-),女,山东省济南市人,硕士研究生,主要从事微流控芯片系统方面的研究。电话:(023)68752306-801

通讯作者:张惠静,电话:(023)68752307,E-mail: zhanghuijing@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2006-09-08;修回日期:2006-10-28

含 2% APTES 的丙酮溶液加入已准备好的芯片微通道中，使其充满微通道。充分反应 60 s 后用丙酮反复冲洗微通道，负压抽干。最后用无菌去离子水冲洗，负压抽干。

用 pH = 6.0 的 MES 缓冲液溶解 RGD，配制 4 mg/ml RGD 工作液。

每 1 ml RGD 工作液中加入 0.4 mg EDC（~2 mmol/L）和 0.6 mg NHS（~5 mmol/L），室温反应 15 min。在上一步反应液中加入过量的 0.1 mol/L PBS 缓冲液，来终止第 1 步的 NHS-RGD 活化酯形成的反应。通过调整 PBS 缓冲液的量，使得 RGD 的浓度分别为：0.1 mg/ml。将反应液注入硅烷化后的芯片中，使溶液充满通道，放入湿盒中室温反应 2 h。

1.3　A549 细胞培养与细胞悬液的制备

1.3.1　A549 细胞的培养　　将冻存的 A549 细胞复苏，接种于 50 ml 的培养瓶中，加入 10% 的血清和双抗（青霉素：100 U/ml；链霉素：100 U/ml）的 1640 培养基中，于 37 ℃、5% CO_2、95% 相对湿度的 CO_2 孵箱中培养，2 d 更换培养液，90% 融合时用 0.25% 的胰酶消化传代。

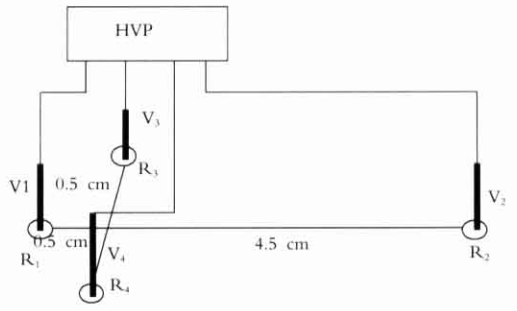
1.3.2　制备细胞悬液　　取对数生长期的细胞，经 0.25% 胰酶消化后，用 PBS 缓冲液吹打细胞，移入离心管，1 000 r/min，5 min 离心细胞，再用 PBS 缓冲液重新悬浮细胞，制备细胞密度分别为每毫升 10^3、10^4、10^5 的细胞悬液。

1.4　肺肿瘤细胞（A549）的筛选/捕捉实验

1.4.1　芯片准备　　将微流控芯片的通道用 10 mg/ml 的 BSA 进行非特异性封闭，后经 PBS 缓冲液冲洗，负压抽干，备用。

1.4.2　进样　　将 0.01 mol/L PBS 缓冲液加入 RGD 多肽功能化的芯片中，使微通道及储液池内充满缓冲液。把储液池 R_2 处的缓冲液吸干，以制备好的细胞悬液（15 μl）替换。将此芯片放入搭建好的电驱系统中，运行脉冲进样电压以驱动细胞进入微通道中，此时在倒置显微镜下对进入芯片微通道的细胞进行全通道计数。

1.4.3　脉冲进样电压的运行参数　　电驱系统搭建如图 1 所示。



R_1、R_2、R_3、R_4：储液池；HVP：高压电源；V_1、V_2、V_3、V_4：输出电压

图 1　微流控芯片电流回路连接示意图

整个系统采用脉冲加压方式，设计运行电压：V_1 = 0 V（接地），V_2 = 200 V，间隙 5 s，工作 10 s，运行 3 min。

1.5　孵育时间对细胞捕获的影响

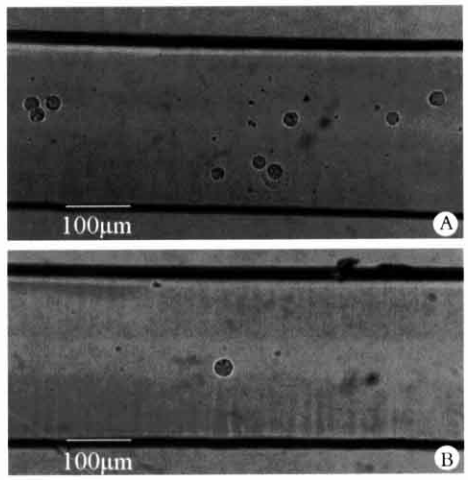
以 10^5/ml 密度的细胞悬液注入芯片中，分别将细胞在通道内孵育 5、10、15、20 min。运行冲洗电压程序，对通道冲洗 5 min，在倒置显微镜下计数残留在微通道内的细胞数，以考察孵育时间对对细胞捕获的影响。以未进行多肽功能化的芯片作为空白对照，进行细胞捕获的实验。

冲洗电压程序设计：V_2 = 0 V（接地），V_3 = 5 V，V_4 = 195 V（每隔 5 s 运行 1 次，运行 10 s），V_4 总运行时间 5 min。

2　结果

2.1　不同密度的细胞进入通道中的细胞数量的比较

本研究对进入微通道的细胞在显微镜下观察（图 2），进行全通道计数，本研究对比了不同密度的细胞进入通道中的数量差异，结果表明：随着加样细胞密度的增大，进入微通道中的细胞数量就越多，被筛选和捕获的细胞数量就越大。



A：进样细胞密度为 10^5/ml；B：进样细胞密度为 10^3/ml

图 2　细胞进入微通道中的状态

2.2　孵育时间对细胞捕获的影响

在倒置显微镜下分别对通道中孵育 5、10、15、20 min 后的细胞进行计数，计算其细胞捕获率（细胞捕获率 = 孵育后贴壁的细胞/进样时进入微通道内的细胞总数 × 100%），并与未进行功能化的芯片进行对照，结果显示，经 RGD 修饰后的芯片对细胞的捕获率远高于空白芯片，在孵育 15 min 后，所建立的功能化芯片对 A549 细胞的捕获率已达到 90%，空白对照组仅为 52%，当孵育时间达到 20 min 后时，经过 RGD 功能化的芯片对 A549 细胞的捕获率已为 100%，而空白对照芯片为 65%。

3　讨论

近年来，微流控芯片技术的发展和应用为细胞层次上的生物学研究提供了新的方法和思路[5-7]，但是纵观现今的实验研究，现有的实验研究主要是针对细胞研究中的某一单元或步骤，如细胞培养，筛选/捕捉或分析展开的，整个研究仅处于起步阶段；另一方面，集合了细胞筛选/捕捉以及在线分析检测的实验体系基本上是针对单细胞，并且通过增加芯片微通道的几何构造来筛选、捕捉/定位靶细胞，芯片结构非常复杂，对微机械加工技术要求极高，造价也昂贵，同时由于微尺度下复杂的几何构造，也无法对群体细胞进行研究，

大大地制约了该技术在生物医学领域里的应用和发展。最近,基于目前存在的技术瓶颈,有研究者提出了对芯片微通道进行生物功能化修饰的思路。

本研究以 RGD 短肽与整合素分子的相互识别为理论基础,用 RGD 多肽修饰芯片的微通道,以完成芯片的多肽功能化,从而实现对肿瘤细胞的识别和筛选。为了避免微通道中的缓冲液在持续高电场的作用下发生变性,以致在进样和冲洗时刺激细胞,本实验采用脉冲电驱流体控制系统来驱动液体流动。由于系统自身液体驱动的特点,无法将样品池中的液体全部注入通道,样品池中的细胞进入通道有着很大的随机性,这使得实验中细胞进入微通道的数量有偶然性的因素,当单位容量下细胞密度越大时进入通道中的细胞就越多。另一方面,本实验的结果显示,当细胞密度很低时(10^3/ml),所建立的细胞捕获系统仍可将 A549 细胞捕获。我们通过将细胞在通道中孵育不同的时间讨论了时间对细胞捕获的影响,结果表明随着孵育时间的延长被微通道捕获的细胞也随之增加,直到 20 min 后,进样的细胞可完全被微通道所识别。但是由于细胞在通道中仍会受到重力的影响,产生自由沉降作用,因此,我们设计了空白芯片作对照组,讨论了孵育时间与细胞沉降的关系:随着孵育时间的延长,受到重力的影响,越来越多的细胞会沉积在通道底部,由于肿瘤细胞有一定的黏附性,这些细胞会吸附在通道的底部。而这种因重力所沉积的细胞与微通道壁结合不牢固,极易被冲洗下来,因此在相同孵育时间内经 RGD 固定的芯片所捕获的细胞要远多于未经固定的芯片。

综上所述,本研究所使用的 RGD 功能化的微流控芯片能够有效的捕获 A549 纯系细胞,捕获的时间大大缩短;在细胞数量很低时,也能完成对肿瘤细胞的捕获。本实验所得到的结果为继续在此芯片上进行后继的研究工作提供了数据基础。

参考文献:

[1] ZHANG Z L, CROZATIER C, LE-BERRE M, *et al*. *In situ* bio-functionalization and cell adhesion in microfluidic devices[J]. Microelectron Eng, 2005, 78-79: 556-562.

[2] DU Z, COLLS N, CHENG K H, *et al*. Microfluidic-based diagnostics for cervical cancer cells[J]. Biosens Bioelectron, 2006, 21(10): 1991-1995.

[3] HIRASAWA M, SHIJUBO N, UEDE T, *et al*. Integrin expression and ability to adhere to extracellular matrix proteins and endothelial cells in human lung cancer lines[J]. Br J Cancer, 1994, 70(3): 466-473.

[4] FALCIONI R, CIMINO L, GENTILESCHI M P, *et al*. Expression of β1, β3, β4, and β5 integrins by human lung carcinoma cells of different histotypes[J]. Exp Cell Res, 1994, 210(1): 113-122.

[5] PANARO N J, LOU X J, FORTINA P, *et al*. Micropillar array chip for integrated white blood cell isolation and PCR[J]. Biomol Eng, 2005, 21(6): 157-162.

[6] LEE P J, HUNG P J, RAO V M, *et al*. Nanoliter scale microbioreactor array for quantitative cell biology[J]. Biotechnol Bioeng, 2006, 94(1): 5-14.

[7] CHANG W C, LEE L P, LIEPMANN D. Biomimetic technique for adhesion-based collection and separation of cells in a microfluidic channel[J]. Lab Chip, 2005, 5(1): 64-73.

(编辑 薛国文)

(上接2255页)

2.2 家兔与人血液流变学参数值范围的比较

人的参考值范围由生产血液流变仪厂家提供,从表2可知,家兔血液流变学参数值波动范围较小,与人的参考值比较,除红细胞电泳时间较快外,其余参数值基本上在人的参考值范围之内。

表2 人与家兔血液流变学参数值范围的比较

项目	人	兔
全血高切(200/s,mPa·s)	3.88-5.40	3.81-4.17
全血中切(30/s,mPa·s)	4.68-6.37	4.85-5.17
全血低切(3/s,mPa·s)	9.02-12.56	9.03-10.45
高切还原黏度	4.62-9.81	6.39-7.61
中切还原黏度	6.34-12.53	8.52-10.06
低切还原黏度	13.16-30.50	20.00-23.24
红细胞聚集指数	5.16-10.53	6.03-7.59
红细胞变形指数	0.58-1.14	0.74-0.86
红细胞刚性指数	1.99-11.73	3.46-4.82
红细胞压积(L/L)	0.40-0.50	0.38-0.44
红细胞计数	4.32-5.40	4.07-4.67
红细胞电泳时间(s)	15.76-20.06	13.14-15.62
血浆黏度(mPa·s)	1.16-1.71	1.34-1.84
上清黏度	0.99-2.64	1.78-2.06
上清屈服应力	7.68-13.39	9.19-10.61
纤维蛋白原(g/L)	2.00-4.00	2.64-4.06

3 讨论

家兔血液流变学参数值与性别关系不明显,这与文献[2]和使用本血液流变仪测得人的参考值范围不分性别一致,但与文献[3]相反,这可能与兔的品种、使用仪器及观察指标不同有关,可见各实验室应该建立自己的正常参考值。家兔血液流变学参数值波动范围很小,与人的参考值比较,除红细胞电泳时间较短外,大多数参数值都在人的参考范围之内,有实际应用价值,可以认为在人类疾病动物模型血液流变学研究方面,家兔是理想的实验动物之一。

(致谢:本研究得到我院检验科薛强副主任和郭辉主管技师等技术帮助,在此深表感谢!)

关键词:血液流变学;人类疾病动物模型;家兔

中图法分类号:R331 文献标识码:B

参考文献:

[1] 王伯生.临床血液流变学[M].郑州:河南医科大学出版社,2001:1-34.

[2] 徐秀美,汪新泉,王群林,等.健康家兔血液流变学观察[J].山东医科大学学报,1994,32(1):87.

[3] 刘一凤,石增立,李湘云,等.家兔血液流变学参数及其影响因素[J].中国微循环,1999,3(2):88-89,92.

(编辑 陈聪连)