



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104830683 B

(45)授权公告日 2017.06.30

(21)申请号 201510221851.3

C12Q 1/02(2006.01)

(22)申请日 2015.04.30

G01N 33/68(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

(56)对比文件

申请公布号 CN 104830683 A

CN 102124096 A, 2011.07.13,
US 7955504 B1, 2011.06.07,
CN 103952300 A, 2014.07.30,

(43)申请公布日 2015.08.12

审查员 刘春杰

(73)专利权人 大连医科大学附属第二医院

地址 116023 辽宁省大连市沙河口区中山
路467号

(72)发明人 王琪 高占成 许志赟 郭哲

郝华龙 徐一彤

(74)专利代理机构 北京中誉威圣知识产权代理

有限公司 11279

代理人 丛芳

(51)Int.Cl.

C12M 3/00(2006.01)

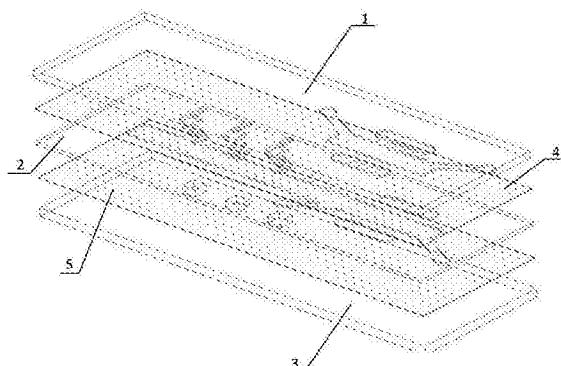
权利要求书2页 说明书10页 附图6页

(54)发明名称

一种用于模拟体内肿瘤细胞及其转移微环境的仿生微流控芯片

(57)摘要

本发明公开了一种用于模拟体内肿瘤细胞及其转移微环境的仿生微流控芯片。该微流控芯片由三层PDMS基片和两层多孔PDMS膜相互交错不可逆封接而成。第一层PDMS基片上设有供空气流通的通道、供液体进出的入口和出口、真空通道的上半部分；第二层PDMS基片上设有供液体流通的通道、供液体进出的入口和出口、真空通道的上半部分；第三层PDMS基片上设有供细胞培养的细胞培养室；第一层PDMS基片上的通道位于第二层PDMS基片上通道的上游，第三层PDMS基片上的细胞培养室位于第二层PDMS基片上通道的下游。本发明的微流控芯片可用于体外检测肿瘤细胞转移的过程，为临床制定肿瘤治疗方案提供基础。



1. 一种用于模拟体内肿瘤细胞及其转移微环境的仿生微流控芯片，其特征在于，所述微流控芯片是由三层PDMS基片和两层多孔PDMS膜相互交错不可逆的封接而成的一个密闭整体；第一层PDMS基片(1)上设有供空气流通的空气通道(11)、供液体进出的第一层液体入口(12)和第一层液体出口(13)，分别位于所述空气通道(11)两侧的第一真空通道(14)的上半部分和第二真空通道(15)的上半部分；第二层PDMS基片(2)上设有供液体流通的液体通道(21)、供液体进出的第二层液体入口(22)和第二层液体出口(23)，分别位于所述液体通道(21)两侧的第一真空通道(14)的下半部分和第一真空通道(15)的下半部分，所述液体通道(21)的侧边上设有三条向外延伸的连接通道，分别为第一连接通道(211)、第二连接通道(212)、第三连接通道(213)，所述第一连接通道(211)、所述第二连接通道(212)、所述第三连接通道(213)的末端分别设有第一入口(214)、第二入口(215)、第三入口(216)；第三层PDMS基片(3)上设有供细胞培养的第一细胞培养室(31)、第二细胞培养室(32)、第三细胞培养室(33)；所述第一细胞培养室(31)、所述第二细胞培养室(32)、所述第三细胞培养室(33)分别位于所述第一连接通道(211)、所述第二连接通道(212)、所述第三连接通道(213)的下方，通过第一多孔PDMS膜(5)与所述第一连接通道(211)、所述第二连接通道(212)、所述第三连接通道(213)相通；所述第一真空通道(14)的上半部分、所述第二真空通道(15)的上半部分和所述第一真空通道(14)的下半部分、所述第二真空通道(15)的下半部分结构相对应形成结构完整的所述第一真空通道(14)和所述第二真空通道(15)；所述第一层液体入口(12)和所述第一层液体出口(13)分别设置于所述空气通道(11)的上下游且同侧；所述第二层液体入口(22)和所述第二层液体出口(23)分别设置于所述液体通道(21)的上下游且同侧，所述空气通道(11)位于所述液体通道(21)的正上方，所述空气通道(11)的开口与所述液体通道(21)的开口相对且通过第二多孔PDMS膜(4)隔开；所述空气通道(11)覆盖在所述液体通道(21)的上游端，所述第一连接通道(211)、所述第二连接通道(212)、所述第三连接通道(213)位于所述液体通道(21)的下游端。

2. 根据权利要求1所述的微流控芯片，其特征在于，所述第一多孔PDMS膜(5)和所述第二多孔PDMS膜(4)的厚度为10μm、孔径为10μm。

3. 根据权利要求1所述的微流控芯片，其特征在于，所述空气通道(11)和所述液体通道(21)的横截面为长方形，尺寸为：长10mm×宽4mm，长35mm×宽4mm；所述第一真空通道(14)、所述第二真空通道(15)的横截面为长方形，尺寸为：长7mm、宽2mm；所述第一细胞培养室(31)、所述第二细胞培养室(32)、所述第三细胞培养室(33)的横截面形状为长方形，尺寸为：高1.5mm、宽1.5mm。

4. 根据权利要求1所述的微流控芯片，其特征在于，所述空气通道(11)的长度为10mm；所述液体通道(21)的长度为35mm；所述第一连接通道(211)、所述第二连接通道(212)、所述第三连接通道(213)距离所述液体通道(21)的上游端的距离是2.2mm。

5. 根据权利要求1所述的微流控芯片，其特征在于，所述第一层液体入口(12)和所述第一层液体出口(13)的距离是15mm；所述第二层液体入口(22)和所述第二层液体出口(23)的距离是15mm。

6. 根据权利要求1所述的微流控芯片，其特征在于，所述第一连接通道(211)、所述第二连接通道(212)、所述第三连接通道(213)相互平行。

7. 根据权利要求1所述的微流控芯片，其特征在于，所述第一真空通道(14)与所述空气

通道(11)的距离是2mm;所述第二真空通道(15)与所述空气通道(11)的距离是2mm。

8.一种权利要求1-7中任一项所述的微流控芯片的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括以下步骤:

(1)制备具有权利要求1-7中任一项所述的微流控芯片中的微通道和微结构的SU-8阳模;

(2)以步骤(1)制备的SU-8阳模为模板,以PDMS为原料复制,制备成权利要求1-7中任一项所述的第一层PDMS基片、第二层PDMS基片、第三层PDMS基片;

(3)制备两个权利要求1所述的多孔PDMS膜;

(4)将步骤(2)制备的所述第一层PDMS基片、所述第二层PDMS基片、所述第三层PDMS基片和步骤(3)制备的两张所述多孔PDMS膜相互交错放置封接而成。

9.根据权利要求8所述的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括以下步骤:

(1)用计算机辅助设计软件CAD绘制权利要求1-7中任一项所述的微流控芯片中的微通道和微结构;将绘制图打印在SU-8胶片上作为掩膜,采用标准光刻工艺制作模具;

(2)将PDMS和固化剂按质量比10:1混匀,抽真空之后浇涂在步骤(1)制备的模具表面,80℃烘制1h;

(3)冷却后缓慢将PDMS在模板上撕下,在PDMS基片相应位置钻出入口、出口,然后切割成合适大小;

(4)多孔PDMS膜制作是PDMS和固化剂按质量比15:1混匀,匀胶机3000rpm,1分钟,抽真空之后浇涂在步骤(1)制备的模具表面,65℃烘制过夜;冷却后缓慢将PDMS在模板上撕下,备用。

一种用于模拟体内肿瘤细胞及其转移微环境的仿生微流控芯片

技术领域

[0001] 本发明属于临床应用领域,涉及一种用于模拟体内肿瘤及其转移微环境的仿生微流控芯片。本发明的微流控芯片可以动态监测肿瘤细胞的转移过程,定义肿瘤细胞的迁移模式,为预防和治疗肿瘤转移提供指导。

背景技术

[0002] 癌细胞转移是包括肺癌在内的所有癌症死亡的主要原因,属于基础研究者和临床学者的最大挑战之一。癌细胞转移是一个复杂的生理过程,通常包括主位点肿瘤病变增殖、肿瘤细胞脱离、肿瘤细胞迁移、溢出并在第二器官处形成转移性的肿瘤细胞团。具有转移性表型的肿瘤细胞表现出以下性质:细胞移动性增强、降解基底膜组分的能力增强、向周围细胞迁移的能力增强、穿透淋巴管或者血管的能力增强、在第二位点自主增殖的能力增强。然而,肿瘤细胞迁移具有高度器官选择性、该过程涉及肿瘤细胞和宿主器官之间的相互作用。到目前为止,器官特异性的肿瘤转移的精确机制还未完全研究清楚。

[0003] 肺癌是世界上癌症死亡的最主要因素,癌症细胞转移到远处的器官是肺癌死亡的主要起因。临床结果显示,肺癌经常转移到脑组织、骨组织和肝脏组织中。更好的了解肺癌转移模式对于制定针对肺癌病人的治疗策略是非常关键的。因此,发展一种在体外能够模拟肺癌转移体内微环境的体外细胞培养模型是亟待解决的问题。

[0004] 了解肺癌细胞转移的病理学需要在整个具有生理活性的肺和远处器官的环境下研究具有生理活性的癌症细胞和组织的功能。然而,目前存在的用于评价正常生理和疾病过程的动物模型是十分昂贵的,并且实验周期很长,同时还存在多种伦理争议。更为重要的是,上述动物模型不能很好的控制转移的肺癌细胞的定位和趋向性,从而导致不能正确的反应人类体内肺癌细胞转移的生理状态。近年来,一种体外3D细胞培养模型得到了越来越广泛的应用。上述体外3D细胞培养模型已经被用于多种肿瘤细胞和间质细胞的共培养。这些模型可以容易控制条件去研究旁分泌信号对不同类型细胞之间的影响。发明人在现有的3D细胞培养模型基础上进行升级和改造,开发了可以用于模拟体内肺癌转移微环境的仿生微流控芯片。

发明内容

[0005] 为了解决现有技术中存在的问题,本发明提供了一种用于模拟体内肿瘤细胞及其转移微环境的仿生微流控芯片。该微流控芯片中可以将不同细胞进行共培养,动态监测上游肿瘤细胞向下游靶器官转移的过程,为临床制定肿瘤治疗方案提供基础。

[0006] 本发明的上述微流控芯片采用了如下设计方案:

[0007] 所述微流控芯片是由三层PDMS基片和两层多孔PDMS膜相互交错不可逆的封接而成的一个密闭整体;第一层PDMS基片1上设有供空气流通的空气通道11、供液体进出的第一层液体入口12和第一层液体出口13,分别位于所述空气通道11两侧的第一真空通道14、第

二真空通道15的上半部分；第二层PDMS基片2上设有供液体流通的液体通道21、供液体进出的第二层液体入口22和第二层液体出口23，分别位于所述液体通道21两侧的第一真空通道14、第二真空通道15的下半部分，所述液体通道21的侧边上设有三条向外延伸的连接通道，分别为第一连接通道211、第二连接通道212、第三连接通道213，所述第一连接通道211、所述第二连接通道212、所述第三连接通道213的末端分别设有第一入口214、第二入口215、第三入口216；第三层PDMS基片3上设有供细胞培养的第一细胞培养室31、第二细胞培养室32、第三细胞培养室33；所述第一细胞培养室31、所述第二细胞培养室32、所述第三细胞培养室33分别位于所述第一连接通道211、所述第二连接通道212、所述第三连接通道213的下方，通过第一多孔PDMS膜5与所述第一连接通道211、所述第二连接通道212、所述第三连接通道213相通；所述第一真空通道14、第二真空通道15的上半部分和所述第一真空通道14、第二真空通道15的下半部分结构相对应形成结构完整的所述第一真空通道14和所述真空通道15；所述第一层液体入口12和所述第一层液体出口13分别设置于所述空气通道11的上下游且同侧；所述第二层液体入口22和所述第二层液体出口23设置于所述液体通道21的上下游且同侧，所述空气通道11位于所述液体通道21的正上方，所述空气通道11的开口与所述液体通道21的开口相对且通过第二多孔PDMS膜4隔开；所述空气通道11覆盖在所述液体通道21的上游端，所述第一连接通道211、所述第二连接通道212、所述第三连接通道213位于所述液体通道21的下游端。

[0008] 进一步，所述第一多孔PDMS膜5、所述第二多孔PDMS膜4的厚度为 $10\mu\text{m}$ 、孔径为 $10\mu\text{m}$ 。

[0009] 进一步，在本发明的具体实施方案中，所述空气通道11和所述液体通道21的横截面为长方形，尺寸为：长 $10\text{mm} \times \text{宽 } 4\text{mm}$ ，长 $35\text{mm} \times \text{宽 } 4\text{mm}$ ；所述第一真空通道14、第二真空通道15的横截面为长方形，尺寸为：高 7mm 、宽 2mm ；所述第一细胞培养室31、所述第二细胞培养室32、所述第三细胞培养室33的横截面形状为长方形，尺寸为：高 1.5mm 、宽 1.5mm 。

[0010] 进一步，在本发明的具体实施方案中，所述空气通道11的长度为 10mm ；所述液体通道21的长度为 35mm ；所述第一连接通道211、所述第二连接通道212、所述第三连接通道213距离所述液体通道21的一端的距离是 2.2mm 。

[0011] 进一步，在本发明的具体实施方案中，所述第一层液体入口12和所述第一层液体出口13的距离是 15mm ；所述第二层液体入口22和所述第二层液体出口23的距离是 15mm 。

[0012] 进一步，在本发明的具体实施方案中，所述第一连接通道211、所述第二连接通道212、所述第三连接通道213相互平行。

[0013] 进一步，在本发明的具体实施方案中，所述第一真空通道14与所述空气通道11的距离是 2mm ；所述第二真空通道15与所述空气通道11的距离是 2mm 。

[0014] 本发明的微流控芯片上所有通道是设置于基片上的沟槽；本发明的微流控芯片上的细胞培养室是设置于基片上的凹槽。

[0015] 构成微流控芯片上下两层基材的材料可以是PDMS(聚二甲基硅氧烷)、PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)、PC(聚碳酸酯)、COC树脂、ABS(丙烯腈-苯乙烯-丁二烯共聚物)、玻璃、石英或铜。在本发明的具体实施方案中，所述基材1和基材2的制备材料选用PDMS。

[0016] 本发明还提供了上述微流控芯片的制备方法，所述制备方法包括以下步骤：

[0017] (1) 制备具有上述微流控芯片中微通道和微结构的SU-8阳模；

[0018] (2) 以步骤(1)制备的SU-8阳模为模板,以PDMS为原料复制,制备成第一层PDMS基片、第二层PDMS基片、第三层PDMS基片;

[0019] (3) 制备两张上述微流控芯片中的多孔PDMS膜;

[0020] (4) 将步骤(2)制备的所述第一层PDMS基片、所述第二层PDMS基片、所述第三层PDMS基片和步骤(3)制备的两张所述多孔PDMS膜相互交错放置封接而成。

[0021] 进一步,在本发明的具体实施方案中,本发明的微流控芯片的制备方法如下:

[0022] (1) 用计算机辅助设计软件CAD绘制上述微流控芯片中的微通道、微结构图;将图打印在SU-8胶片(Microchem,型号为2075)上作为掩膜,采用标准光刻工艺制作模具,标准光刻工艺为本领域技术人员熟知;

[0023] (2) 将PDMS(Dow Corning,货号为0007883528)和固化剂按质量比10:1混匀,在真空干燥箱抽真空之后浇涂在步骤(1)制备的模具表面,80℃烘烤1h;

[0024] (3) 冷却后缓慢将PDMS在模板上撕下,在PDMS基片相应位置钻出入口、出口,然后切割成合适大小;

[0025] (4) 多孔PDMS膜制作是PDMS和固化剂按质量比15:1混匀,匀胶机3000rpm,1分钟,抽真空之后浇涂在步骤(1)制备的模具表面,65℃烘制过夜;冷却后缓慢将PDMS在模板上撕下,备用。

[0026] Su-8光刻技术:新型的化学增幅型负像SU-8光刻胶克服了普通光刻胶采用UV光刻深宽比不足的问题,十分适合于制备高深宽比微结构,因此SU-8胶是一种负性、环氧树脂型、近紫外线光刻胶。它在近紫外光(365nm-400nm)范围内光吸收度很低,且整个光刻胶层所获得的曝光量均匀一致,可得到具有垂直侧壁和高深宽比的厚膜图形;它还具有良好的力学性能、抗化学腐蚀性和热稳定性;SU-8在受到紫外辐射后发生交联,是一种化学扩大负性胶,可以形成台阶等结构复杂的图形;且SU-8胶不导电,在电镀时可以直接作为绝缘体使用。由于它具有较多优点,SU-8胶正被逐渐应用于MFMS、芯片封装和微加工等领域。直接采用SU-8光刻胶来制备深宽比高的微结构与微零件是微加工领域的一项新技术。

[0027] 本发明还提供了上述微流控芯片在监测肿瘤细胞转移过程中的应用。使用本发明的微流控芯片监测体内肿瘤细胞转移过程的操作步骤如下:

[0028] 1、实质模拟:将上皮细胞和肿瘤细胞共培养于微流控芯片中的多孔PDMS膜4接触空气的一面。

[0029] 2、间质模拟:将血管内皮细胞和间质细胞(例如成纤维细胞、单核细胞)共培养于微流控芯片中多孔PDMS膜4接触液体的一面。

[0030] 3、肿瘤细胞转移靶器官模拟:将脑组织细胞、骨组织细胞、肝组织细胞分别在微流控芯片中的细胞培养室31、32、33中进行3D培养。

[0031] 4、进行体外构建的肿瘤转移微环境的有效性检测

[0032] 通过检测细胞活力,血管内皮细胞和上皮细胞连接的紧密性,肿瘤细胞诱导的癌相关成纤维细胞、巨噬细胞特异性蛋白的表达来评价利用本发明的微流控芯片构建的模拟肿瘤细胞转移微环境的仿生模型的有效性。

[0033] 5、进行肿瘤细胞转移过程的检测

[0034] 通过检测肿瘤细胞发生上皮-间质转化(EMT)标记蛋白表达评价转移性肿瘤细胞的生成;通过细胞形态的观察比较转移性肿瘤细胞生长模式;通过肿瘤细胞发生间质-上皮

转化(MET)标记蛋白表达评价转移性肿瘤细胞迁移到靶器官之后的变化;通过检测靶器官损坏标记蛋白的表达来评价转移性肿瘤细胞是否已侵袭到靶器官中。

[0035] 在本发明的具体实施方案中,上皮细胞为支气管上皮细胞;肿瘤细胞为肺癌细胞,即使使用本发明的微流控芯片构建了一个模拟肺癌细胞转移微环境的仿生模型。

[0036] 原理:本发明采用PDMS和带有网孔的渗透膜材料,依据体内细胞与细胞、细胞与培养介质、组织与组织间、器官与微环境间相互作用的特性以及流体力学原理,设计和制作一个能够接近肺解剖结构、模拟肺生理功能的多单元集成、多通道连接的高通量微流控芯片实验室。该实验室设计的核心问题是如何重建肺的解剖结构,包括各级支气管、肺泡在内的肺实质和肺间质以及如何模拟肺的主要生理功能,即气体交换。以一层带有网孔的渗透膜替代呼吸运动时可促使扩张的肺泡回缩的弹性纤维,通过在膜上下两面分别支气管上皮细胞、血管内皮细胞、巨噬细胞、成纤维细胞的二维培养,模拟肺实质和间质,并构成了气血屏障,继而在与膜平行方向分别通入气体和液体供应氧分与营养物质,在与膜垂直方向的两侧连接两个真空通道,模拟人体呼吸节律。当真空通道泵入气体时,渗透膜回缩,气体通道氧气泵入,肺泡扩张,模拟肺吸气功能;当真空通道回抽气体时,渗透膜拉伸,气体通道氧气泵出,肺泡收缩,模拟肺呼气功能。至此,构建了一个接近肺解剖结构、能够模拟肺主要生理功能的仿生肺芯片生理模型。在上述仿生芯片肺生理模型基础上,依据绝大多数肺癌起源于支气管粘膜上皮,将肺癌分别接种于支气管上皮细胞区,构建仿生芯片肺癌病理模型;依据肺癌转移途径及好发部位,在上述肺癌病理模型上搭建神经胶质细胞培养室、骨细胞培养室、及肝细胞培养室分别模拟脑、骨、肝等肺癌最常转移的靶器官,构建肺癌不同转移阶段病理模型,再现肺癌侵袭转移全过程。

[0037] 本发明的优点和有益效果为:

[0038] (1) 本发明的微流控芯片可以实现细胞的三维培养,来更好的完成体内生物学功能研究;该微流控芯片用于检测的试剂消耗量显著低于传统平台。

[0039] (2) 细胞在本发明的微流控芯片平台中培养具有良好的适应性;微流控芯片的主要材料是PDMS,PDMS具有良好的生物相容性和高度的透气性,气体可以顺畅通过PDMS,从而保证了芯片内培养的细胞与外媒的气体交换。

[0040] (4) 传统平台上细胞生长的静态宏观环境与体内细胞生存微小立体空间相差悬殊,微流控芯片体系则弥补了传统平台在这方面的缺陷,它具有更好的密闭性,因此细胞生存空间的大小与人体内细胞生存的生理微空间更加相似,这种微小空间内的原位在线检测也进一步增加了检测结果的可信度。

[0041] (5) 本发明的微流控芯片平台操作简便,省时省力。

附图说明

[0042] 图1显示本发明的微流控芯片结构的分解图;

[0043] 图2显示本发明的微流控芯片结构的分解图;

[0044] 图3显示本发明的微流控芯片整体结构的俯视图;

[0045] 图4显示本发明的微流控芯片的第一层基片结构的侧视图;

[0046] 图5显示本发明的微流控芯片的第二层基片结构的侧视图;

[0047] 图6显示本发明的微流控芯片的第三层基片结构的侧视图;

[0048] 图7显示本发明的微流控芯片的多孔PDMS膜的侧视图；

[0049] 图8显示利用H33342/PI染色检测芯片中细胞活力以及利用免疫染色检测支气管上皮细胞16HBE和血管内皮细胞HUVEC的连接情况，其中，A:16HBE细胞24H后的细胞形态；B:HUVEC细胞24H后的细胞形态；C:16HBE细胞48H后的细胞形态；D:HUVEC细胞48H后的细胞形态；E:16HBE细胞H33342/PI染色；F:HUVEC细胞H33342/PI染色；G:16HBE细胞中E-cadherin蛋白免疫染色；H:HUVEC细胞中E-cadherin蛋白免疫染色；

[0050] 图9显示利用Immunofluorescence cell tracker expression assay检测肺癌细胞A549和支气管上皮细胞16HBE的共定位情况以及利用免疫染色检测肺癌细胞、成纤维细胞、巨噬细胞的特异性蛋白的表达情况，其中，A:16HBE细胞形态，B:16HBE与A549共培养的细胞形态；C:16HBE细胞cell tracker染色；D:16HBE与A549共培养cell tracker染色；E:16HBE细胞CEA蛋白免疫染色；F:16HBE与A549共培养CEA蛋白免疫染色；G:成纤维细胞中 α -SMA蛋白免疫染色；H:CAF(癌相关成纤维细胞)中 α -SMA蛋白免疫染色；I:巨噬细胞中CD206蛋白免疫染色；J:CAM(癌相关巨噬细胞)中CD206蛋白免疫染色；

[0051] 图10显示利用免疫染色检测肺癌细胞中上皮细胞间质转化marker的表达情况，其中，A:细胞免疫染色图；B:光密度值统计图；

[0052] 图11显示肺癌细胞A549到远端组织的迁移情况以及在远端组织处的生长模式，其中，A:肺癌细胞迁移细胞数量的统计；B:肺癌细胞在远端组织处的细胞形态；

[0053] 图12显示利用免疫染色来检测远端组织中特征性蛋白的表达情况，其中，A:特征性蛋白免疫染色图；B:光密度值统计图；

[0054] 其中，1:第一层基片；11:空气通道；12:第一层液体入口；13:第一层液体出口；14:第一真空通道；15:第二真空通道；2:第二层基片；21:液体通道；22:第二层液体入口；23:第二层液体出口；211:第一连接通道；212:第二连接通道；213:第三连接通道；214:第一入口；215:第二入口；216:第三入口；3:第三层基片；31:第一细胞培养室；32:第二细胞培养室；33:第三细胞培养室；4:第二多孔PDMS膜；5:第一多孔PDMS膜。

具体实施方式

[0055] 通过参阅下述实施例可以更容易地了解本发明的内容，这些实施例只是为进一步说明本发明，并不意味着限定本发明的范围。

[0056] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。

[0057] 下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

[0058] 实施例1一种用于模拟体内肺癌转移微环境的仿生微流控芯片

[0059] 本发明的微流控芯片是由三层PDMS基片和两层多孔PDMS膜相互交错不可逆的封接而成的一个密闭整体；第一层PDMS基片1上设有供空气流通的空气通道11、供液体进出的第一层液体入口12和第一层液体出口13，分别位于空气通道11两侧的第一真空通道14、第二真空通道15的上半部分；第二层PDMS基片2上设有供液体流通的液体通道21、供液体进出的第二层液体入口22和第二层液体出口23，分别位于液体通道21两侧的第一真空通道14、第二层液体15的下半部分，液体通道21的侧边上设有三条向外延伸的连接通道，分别为第一连接通道211、第二连接通道212、第三连接通道213，第一连接通道211、第二连接通道212、第三连接通道213的末端分别设有第一入口214、第二入口215、第三入口216；第三层

PDMS基片3上设有供细胞培养的第一细胞培养室31、第二细胞培养室32、第三细胞培养室33；第一细胞培养室31、第二细胞培养室32、第三细胞培养室33分别位于第一连接通道211、第二连接通道212、第三连接通道213的下方，通过第一多孔PDMS膜5与第一连接通道211、第二连接通道212、第三连接通道213相通；第一真空通道14、第二真空通道15的上半部分和第一真空通道14、第二真空通道15的下半部分结构相对应形成结构完整的第一真空通道14和第二真空通道15；第一层液体入口12和第二层液体出口13分别设置于空气通道11的上下游且同侧；第二层液体入口22和第二层液体出口23设置于液体通道21的上下游且同侧，空气通道11位于液体通道21的正上方，空气通道11的开口与液体通道21的开口相对且通过第二多孔膜4隔开；空气通道11覆盖在液体通道21的上游端，第一连接通道211、第二连接通道212、第三连接通道213位于液体通道21的下游端。

[0060] 第二多孔PDMS膜4和第一多孔PDMS膜5的厚度为 $10\mu\text{m}$ 、孔径为 $10\mu\text{m}$ 。

[0061] 空气通道11和液体通道21的横截面为长方形，尺寸为：长 $10\text{mm} \times$ 宽 4mm ，长 $35\text{mm} \times$ 宽 4mm ；第一真空通道14、第二真空通道15的横截面为长方形，尺寸为：高 7mm 、宽 2mm ；第一细胞培养室31、第二细胞培养室32、第三细胞培养室33的横截面形状为长方形，尺寸为：高 1.5mm 、宽 1.5mm 。

[0062] 空气通道11的长度为 10mm ；液体通道21的长度为 35mm ；第一连接通道211、第二连接通道212、第三连接通道213距离液体通道21的一端的距离是 2.2mm 。

[0063] 第一层液体入口12和第一层液体出口13的距离是 15mm ；第二层液体入口22和第二层液体出口23的距离是 15mm 。

[0064] 第一连接通道211、第二连接通道212、第三连接通道213相互平行。

[0065] 第一真空通道14与空气通道11的距离是 2mm ；第二真空通道15与空气通道11的距离是 2mm 。

[0066] 本发明的微流控芯片上所有通道是设置于基片上的沟槽；本发明的微流控芯片上的细胞培养室是设置于基片上的凹槽。

[0067] 实施例2实施例1中的微流控芯片的制备

[0068] 实施例1中的微流控芯片的制备方法包括以下步骤：

[0069] (1) 用计算机辅助设计软件CAD绘制上述微流控芯片中的微通道、微结构图；将图打印在SU-8胶片(Microchem, 型号为2075)上作为掩膜，采用标准光刻工艺制作模具，标准光刻工艺为本领域技术人员熟知；

[0070] (2) 将PDMS(Dow Corning, 货号:0007883528)和固化剂按质量比 $10:1$ 混匀，在真空干燥箱抽真空之后浇涂在步骤(1)制备的模具表面， 80°C 烘烤 1h ；

[0071] (3) 冷却后缓慢将PDMS在模板上撕下，在PDMS基片相应位置钻出入口、出口，然后切割成合适大小；

[0072] (4) 多孔PDMS膜制作是PDMS和固化剂按质量比 $15:1$ 混匀，匀胶机 3000rpm , 1分钟 ，抽真空之后浇涂在步骤(1)制备的模具表面， 65°C 烘制过夜；冷却后缓慢将PDMS在模板上撕下，备用。

[0073] 实施例3模拟体内肺癌细胞转移微环境的仿生模型的构建

[0074] 1、微流控芯片中肺癌细胞的2D培养

[0075] (1) 微流控芯片使用紫外线照射杀菌，多孔PDMS膜上包被有BME，具体包被过程为：

对芯片进行预处理,以利细胞更好的附着在芯片多孔膜表面。按1:10比例稀释BME (Cultrex basement membrane extract,R&D Systems,McKinley Place,MN,USA),充分混合后用微量加样器注入微流控芯片的样本入口,孵箱过夜等待胶凝固。

[0076] (2) 将微流控芯片翻转,即第三层PDMS基片朝上。将悬浮的单核细胞收集到离心管中,1000rpm离心5分钟,弃上清,加入新鲜培养基制备细胞悬液。将单核细胞悬液通过入口22注入到通道21中,使其以 10^3 个/ cm^2 的密度种植到多孔膜PDMS膜上,之后使用注射泵以24mm/h的容积流速将PMA培养基

[0077] (100ng/ml) 通过入口22注入到微流控芯片中,多余培养基通过出口23排除。将微流控芯片倾斜以允许细胞移动到通道21的一边。将芯片倾斜向一侧30度,以使单核细胞沉降到中央培养通道的一侧,置于37℃、5%CO₂孵箱培养。48h后的单核细胞被刺激为巨噬细胞。

[0078] (3) 刺激单核细胞变成M0巨噬细胞后,将PMA培养基更换成正常培养基(1640培养基)。

[0079] (4) 将人类肺成纤维细胞种植以 10^4 个/ cm^2 的密度种植到M0巨噬细胞生长的位置(待细胞增殖至对数生长期,用0.25%胰蛋白酶消化,加入新鲜的培养基吹打成细胞悬液,1000rpm离心5分钟,弃上清,加入新鲜培养基,制造成纤维细胞悬液。将肺成纤维细胞WI38以 10^4 个细胞/ cm^2 的细胞密度接种到巨噬细胞的同侧,使其附着到多孔膜表面,置于37℃、5%CO₂孵箱静态条件下培养4小时。

[0080] (5) 将微流控芯片回复到水平状态,将血管内皮细胞HUVEC悬液通过入口22注入到通道21中,使其以 10^4 个/ cm^2 的密度种植到多孔PDMS膜上,粘附在通道21的另一边。

[0081] (6) 待芯片多孔膜下侧细胞均贴壁生长后,翻转芯片从上侧通过入口2以 10^4 个细胞/ cm^2 的细胞密度将支气管上皮细胞16HBE注入芯片,静态使其附着在膜表面4小时后,小心从出口2将培养基轻轻地从上部通道抽吸,继续通过入口连续泵入混合培养基,置于37℃、5%CO₂孵箱培养。将培养基通过出口13排除。

[0082] (7) 待上述细胞长满后,将肺癌细胞悬液通过入口12注入到通道11中,使其以 10^3 个/ cm^2 的密度种植到多孔PDMS膜上接种到芯片上层支气管上皮细胞区,静置4h使其贴附。将培养基通过出口13排除。

[0083] 2、微流控芯片中脑组织细胞、骨组织细胞、肝组织细胞的3D培养

[0084] (1) 将星形胶质细胞、成骨细胞和肝细胞(购自中国科学院上海生科院细胞中心,)使用胰酶消化,使其重悬在冰预冷的细胞基底膜提取物混合物中(R&D,补充货号),分别将细胞悬液与BME等体积混合。

[0085] (2) 将微流控芯片置于37℃环境中静置30min使BME胶化。通过入口22将培养基注入微流控芯片中,连续泵入。于此同时,将出口23封住,使多余的培养基从入口214、215、216排出。

[0086] (4) 将微流控芯片放置于湿度为95%、二氧化碳浓度为5%的37℃培养箱中培养(真空泵参数为physiological cyclic strain (10%at 0.2Hz))。孵育时间24h,进行后续实验。

[0087] 实施例4模拟体内肺癌细胞转移微环境的仿生模型的有效性检测

[0088] 评价实施例3构建的模拟体内肺癌细胞转移微环境的仿生模型的有效性,通过以

下实验来完成：

[0089] 1、细胞活力的检测

[0090] 检测方法：在芯片系统中吸去通道中培养液，将PBS注入芯片通道内，清洗不同处理组的细胞2次；之后泵入H33342（1:100）染色15分钟，PBS溶液清洗2次；后泵入PI染色（1:200）5分钟，PBS溶液清洗2次；在显微镜下，观察在相应激发光激发下的荧光强度并照相记录。

[0091] 2、肺癌细胞和支气管上皮细胞共定位的检测

[0092] 细胞示踪剂C7000CM-Dil将肺癌细胞标记为红色：芯片接种前将肺癌细胞重悬于C7000CM-Dil工作液中（1 μ g/ μ L）37℃孵育5min, 4℃放置15min。

[0093] 3、人类支气管上皮细胞和血管内皮细胞的生长模式的观察

[0094] 使用E钙粘蛋白的免疫染色检测微流控芯片中支气管上皮细胞和血管内皮细胞连接的紧密性。E钙粘蛋白免疫染色过程如下：

[0095] a、使用PBS冲洗微流控芯片中膜两侧的支气管上皮细胞和血管内皮细胞；

[0096] b、使用4%多聚甲醛固定细胞15min, 0.5%PBST溶液破膜10分钟，PBS溶液清洗2次；

[0097] c、将封闭血清稀释液注入芯片培养池中，放入湿盒内，37℃孵育1小时；用新鲜配制的5%BSA稀释羊封闭血清原液，按照1:100的比例稀释，用振荡器混匀；

[0098] d、使用终浓度为2 μ g/mL的E钙粘蛋白抗体（Abcam）稀释液孵育2h；

[0099] e、使用Alexa 594偶联的二抗孵育1h；

[0100] f、使用终浓度为10 μ g/mL的DAPI染色，时间为15min；使用荧光显微镜照相。

[0101] 4、检测肺癌细胞、与癌相关成纤维细胞、巨噬细胞的特征

[0102] 使用免疫染色的方法检测肿瘤细胞标记蛋白CEA的表达、成纤维细胞标记蛋白 α -SMA的表达、巨噬细胞标记蛋白CD206的表达，标记结果使用免疫荧光显微镜呈现。

[0103] 免疫染色过程如下：

[0104] a、使用PBS清洗微流控芯片中肺癌细胞、成纤维细胞、巨噬细胞；

[0105] b、使用4%多聚甲醛固定细胞15min, 0.5%PBST溶液破膜10分钟，PBS溶液清洗2次；

[0106] c、将封闭血清稀释液注入芯片培养池中，放入湿盒内，37℃孵育1小时。用新鲜配制的5%BSA稀释羊封闭血清原液，按照1:100的比例稀释，用振荡器混匀；

[0107] e、使用抗人CEA蛋白的抗体（1:100, abcam），抗人 α -SMA蛋白的抗体（1:200, Santa Cruz）、抗人CD206蛋白的抗体（1:50, abcam）孵育2h；

[0108] f、使用Alexa 488或者594偶联的二抗孵育1h；使用终浓度为10 μ g/mL的DAPI染色，时间为15min；使用荧光显微镜照相。

[0109] 2、实验结果：

[0110] 2.1细胞活力的结果：细胞活力95%以上（Fig.8E-F）。

[0111] 2.2immunofluorescence cell tracker expression assay结果表明肺癌细胞A549和支气管上皮细胞16HBE共定位（图Fig.9C-D）。

[0112] 2.3E-cadherin蛋白免疫染色，实验结果表明支气管上皮细胞16HBE和血管内皮细胞HUVEC相互连接紧密（Fig.8G-H）。

[0113] 2.4肺癌细胞中CEA表达(图Fig.9E-F);成纤维细胞中表达 α -SMA,巨噬细胞中表达CD206,证明了肺癌细胞与间质细胞相互作用导致间质细胞活化,成纤维细胞转化为癌相关成纤维细胞 α -SMA,巨噬细胞转化为癌相关巨噬细胞表达CD206(图Fig.9G、9H、9I、9J)。

[0114] 实施例5利用模拟体内肺癌细胞转移微环境的仿生模型监测肺癌细胞转移过程

[0115] 1、步骤

[0116] 1.1肺癌细胞发生上皮-间质转化(EMT)的检测

[0117] 通过检测上皮-间质转化(EMT)标志物蛋白:E钙粘蛋白、N钙粘蛋白、Snai11、Snai12的表达来评价肺癌细胞是否发生了上皮-间质转化。

[0118] 免疫标记过程如下:

[0119] a、使用PBS清洗多孔膜上的肺癌细胞;

[0120] b、使用4%多聚甲醛固定细胞15min,0.5%PBST溶液破膜10分钟,PBS溶液清洗2次;

[0121] c、将封闭血清稀释液注入芯片培养池中,放入湿盒内,37℃孵育1小时;用新鲜配制的5%BSA稀释羊封闭血清原液,按照1:100的比例稀释,用振荡器混匀;

[0122] d、使用抗人E钙粘蛋白抗体(1:100,Proteintech),抗人N钙粘蛋白的抗体(5 μ g/ml,abcam)、抗人Snai11蛋白的抗体(1:50,abcam)、抗人Snai12蛋白的抗体(1:400,Cell Signaling Technology),孵育2h;

[0123] f、使用Alexa 488或者594偶联的二抗孵育1h;使用终浓度为10 μ g/mL的DAPI染色,时间为15min;使用荧光显微镜照相。

[0124] 1.2转移性肺癌细胞生长模式的鉴定

[0125] 使用C34557标记肺癌细胞;将C34557工作液(10 μ mol/L)加入到1640细胞培养基中,将细胞孵育20min;之后使用新鲜培养基孵育5min,重复4次。(事先用细胞示踪剂C34557将肺癌细胞标记为绿色:芯片接种前将肺癌细胞重悬于C34557工作液中(10 μ mol/L)37℃孵育20min,后重悬于4倍体积培养基中37℃孵育5min)。

[0126] 1.3检测转移性肺癌细胞的侵袭

[0127] 通过检测组织损伤标记蛋白的表达来评价转移性的肺癌细胞是否能够侵袭进入微流控芯片多个远端器官中。使用抗人脑组织损伤标记蛋白CXCR4的抗体(1:100,abcam)、抗人骨组织损伤标记蛋白RANKL抗体(1:50,Santa Cruz Biotechnology)、抗人肝组织损伤标记蛋白AFP抗体进行免疫染色。

[0128] 免疫染色过程如下:

[0129] a、使用PBS清洗细胞2次;

[0130] b、使用4%多聚甲醛固定细胞15min,0.5%PBST溶液破膜10分钟,PBS溶液清洗2次;

[0131] c、将封闭血清稀释液注入芯片培养池中,放入湿盒内,37℃孵育1小时;用新鲜配制的5%BSA稀释羊封闭血清原液,按照1:100的比例稀释,用振荡器混匀;

[0132] e、使用上述一抗,孵育2h;

[0133] f、使用Alexa 488或者594偶联的二抗孵育1h;使用终浓度为10 μ g/mL的DAPI染色,时间为15分钟;使用荧光显微镜照相。

[0134] 2、实验结果

[0135] 2.1肺癌细胞上皮-间质转化

[0136] 肺癌细胞和癌症相关的间质细胞培养4d后,肺癌细胞表达EMT,3种EMT marker (N-Ca、Snai11、Snai12) 表达表明肺癌细胞已发生上皮细胞间质转化(Fig.10A-B)。

[0137] 2.2肺癌细胞远距离转移

[0138] 细胞计数可知,非小细胞肺癌细胞A549粘附到脑组织细胞、骨组织细胞、肝组织细胞上部多孔膜上的细胞数量分别是 148 ± 8 个, 364 ± 16 个, 299 ± 13 个;小细胞肺癌细胞H446粘附到脑组织细胞、骨组织细胞、肝组织细胞上部多孔膜上的细胞数量分别是 255 ± 16 个, 128 ± 8 个, 278 ± 18 个(Fig.11A)。上述结果表明A549细胞转移的趋向性是骨组织>肝组织>脑组织;H446细胞转移的趋向性是肝组织>脑组织>骨组织,这些特征和肺癌病人的临床特征相似。

[0139] 2.3转移性的肺癌细胞在多个远端器官处的生长模式

[0140] 用倒置荧光显微镜观察细胞形态。如Fig.11B所示,转移到远端靶器官的细胞形态是成团。

[0141] 2.4转移性肺癌细胞的侵袭

[0142] 结果如Fig.12A和Fig.12B所示,星型胶质细胞H1800中表达CXCR4、成骨细胞Fob中表达RANKL、肝细胞L-02中表达AFP,表明转移性肺癌细胞已经侵袭到靶器官细胞中。

[0143] 通过上述实施例,发现本发明的微流控芯片能够有效地模拟体内肺癌细胞的转移和侵袭过程,为临床制定治疗方案提供基础。

[0144] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,本领域的普通技术人员可以理解:在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由权利要求及其等同物限定。

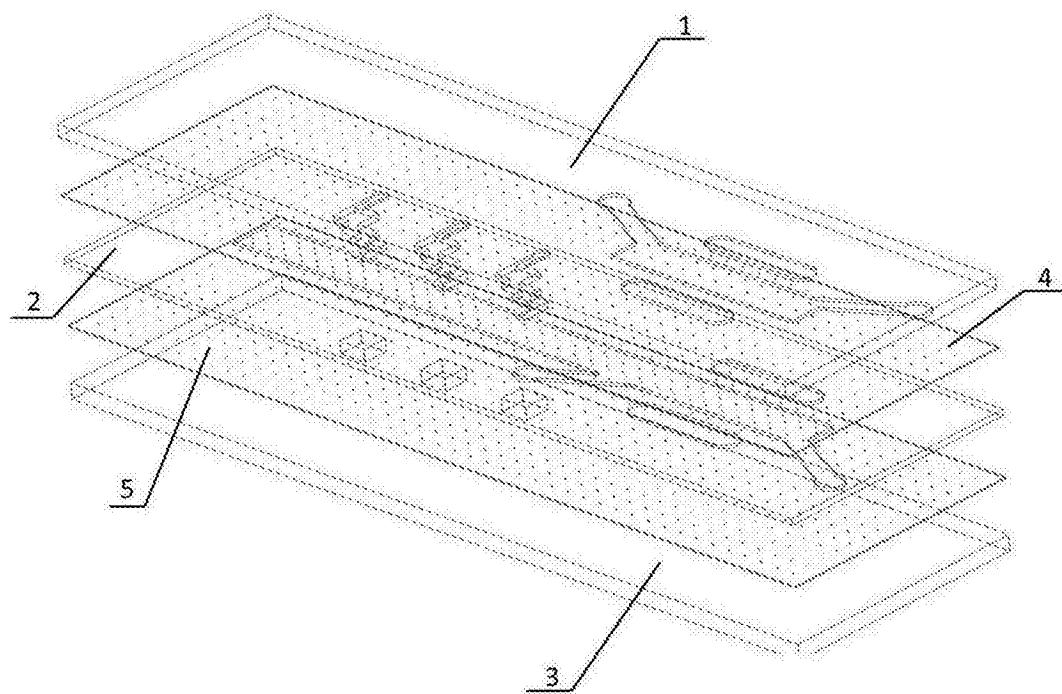


图1

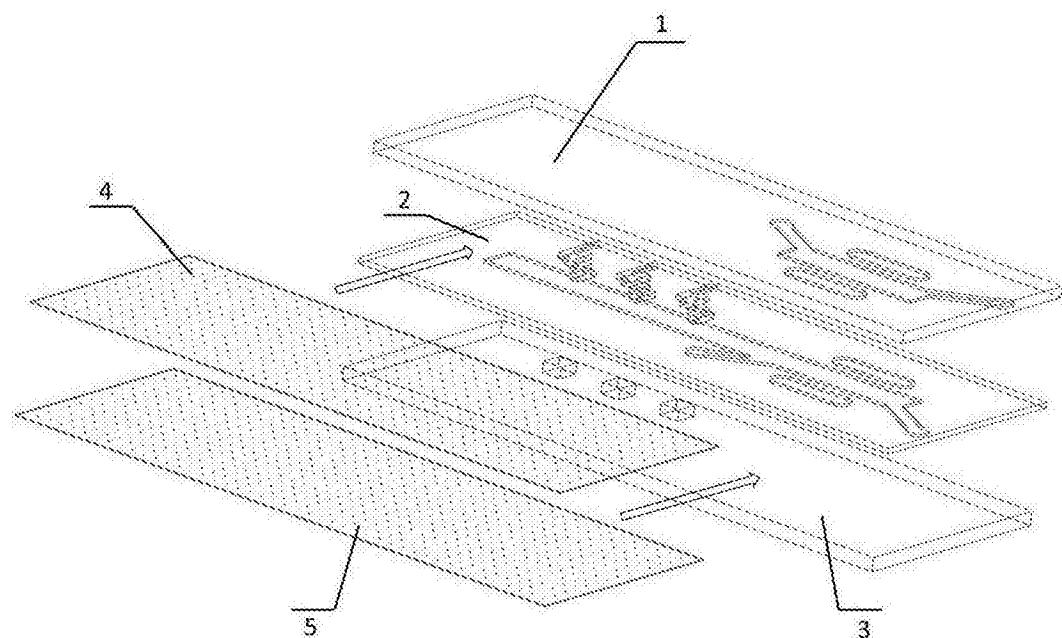


图2

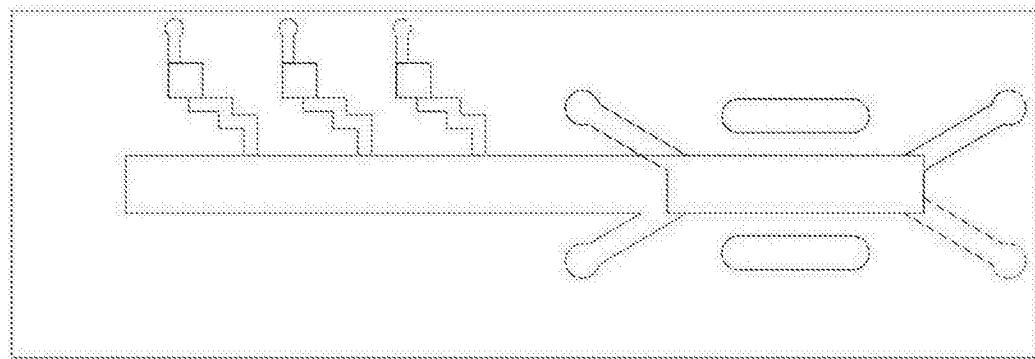


图3

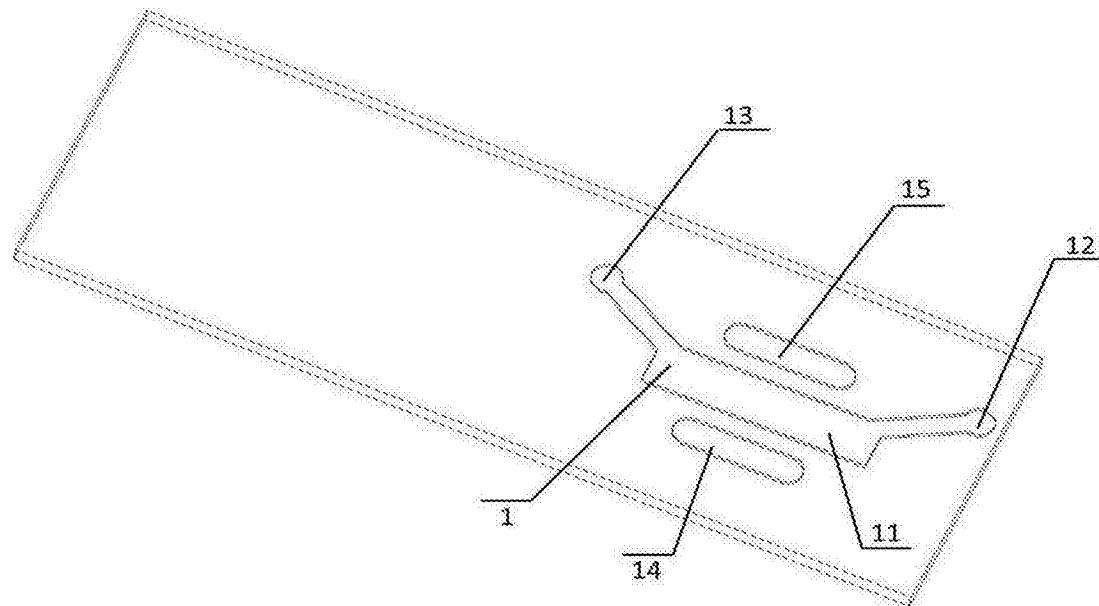


图4

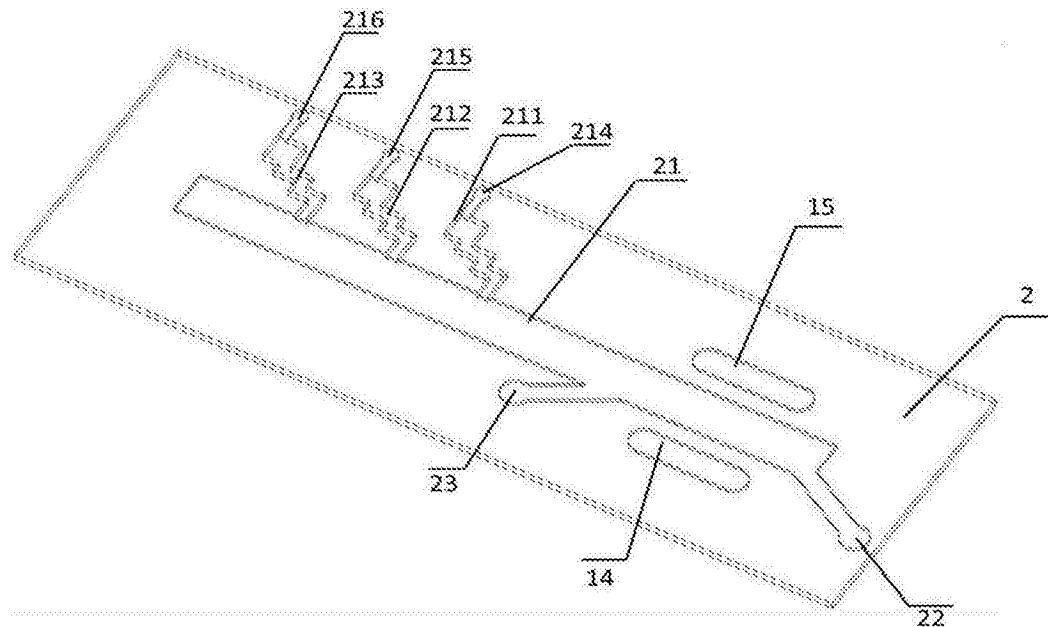


图5

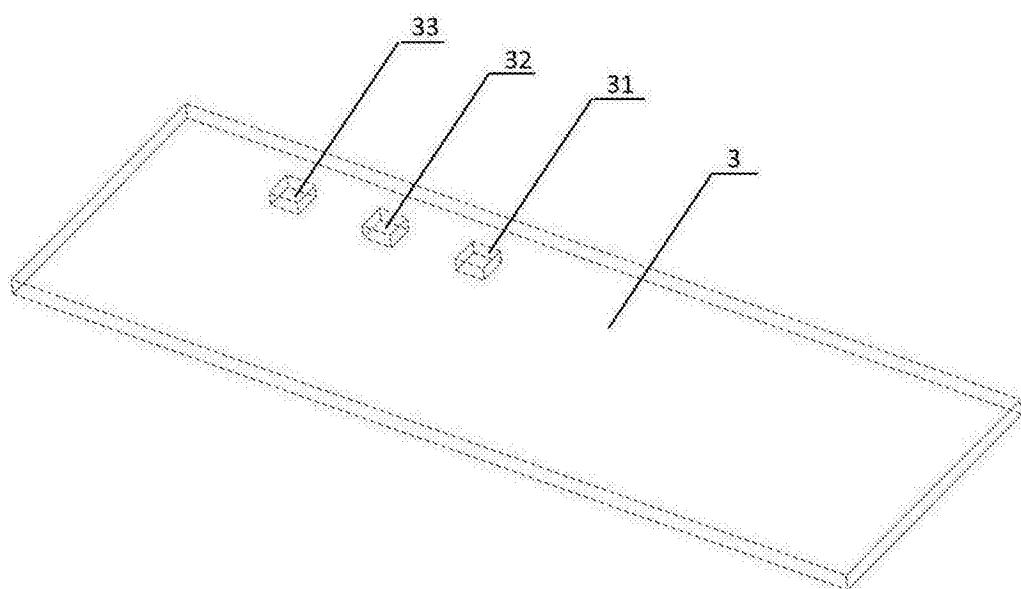


图6

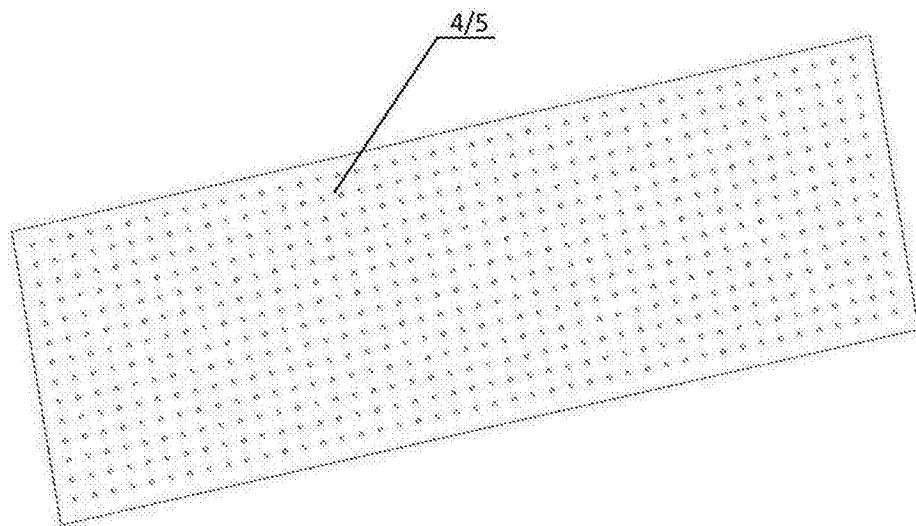


图7

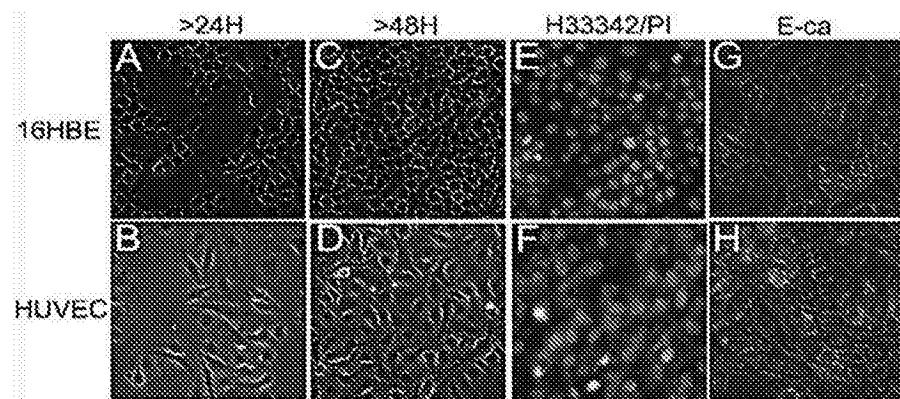


图8

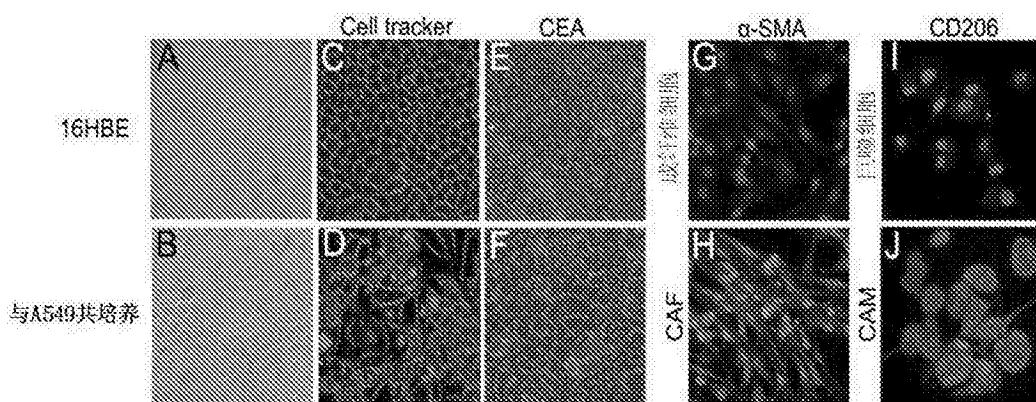


图9

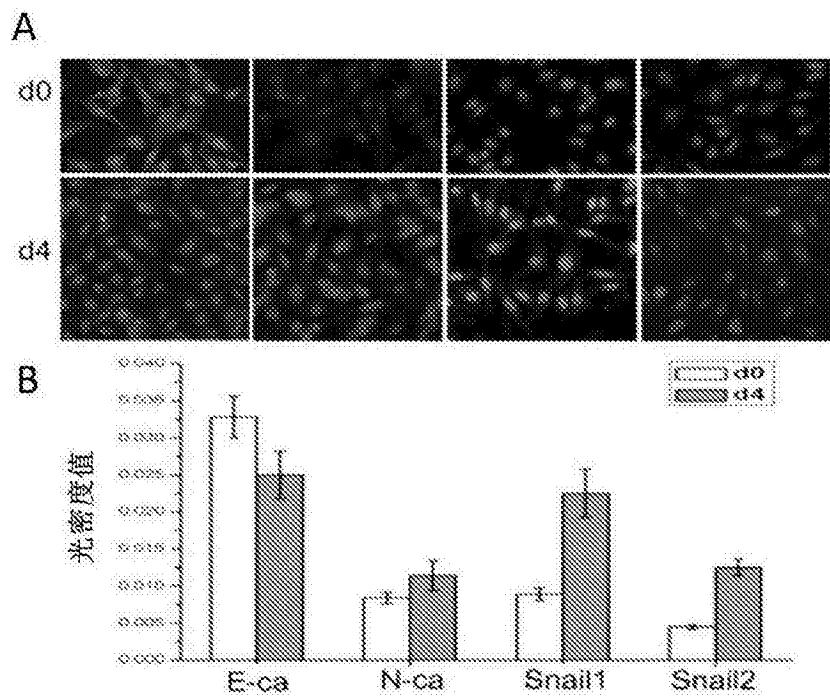


图10

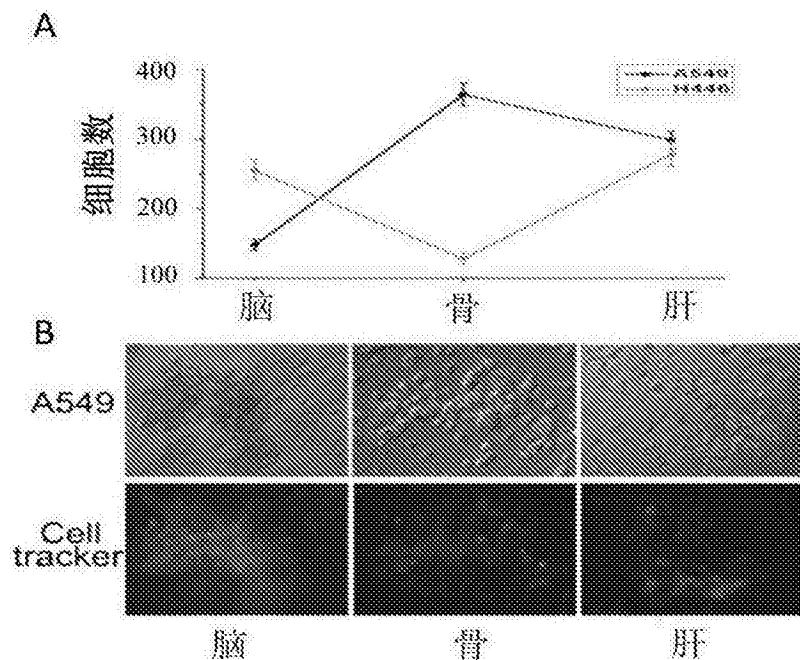


图11

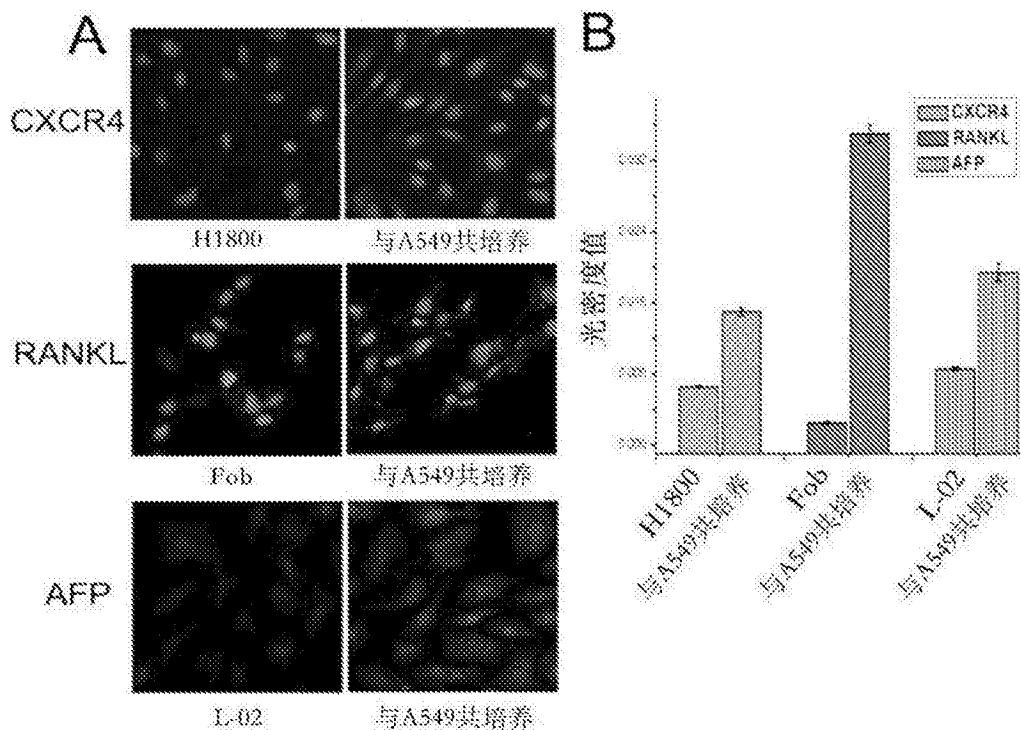


图12