

网络出版时间: 2023-03-28 15:27:21 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20230328.1032.011.html>

集成化六通道微流控细胞迁移芯片的研制及应用

杨道¹ 杨柯² 高朝茹¹ 朱华庆¹ 朱灵²

摘要 目的 探究解决当前细胞迁移研究方法中通量低、难以建立稳定的浓度梯度并实时观察细胞迁移行为等问题。方法 该文设计了一款六通道阵列微流控芯片。首先使用有限元分析软件 COMSOL Multiphysics 5.5 进行多物理场建模和数值模拟以分析细胞迁移主管道的流动行为;然后,通过测试健康人中性粒细胞在该微流控芯片中对于不同类型趋化因子梯度的趋化反应来验证该设备的通量优势;接下来,通过分析 6 例 II 型糖尿病患者和 3 例健康人的中性粒细胞的迁移速度,进一步验证了环形六通道阵列微流控芯片的临床适用性;最后,使用 Pearson 系数分析糖尿病患者中性粒细胞趋化功能与患者部分生理指标的相关性。结果 仿真软件模拟管道内部的浓度梯度数据与管道实时荧光测试数据相符合;健康人中性粒细胞在 100 nmol/L 白细胞介素-8 (IL-8) 环境下,其平均迁移速度为 $(0.21 \pm 0.01) \mu\text{m/s}$,在 100 nmol/L N-甲酰-L-甲硫氨酰-L-白氨酰-L-苯丙氨酸 (fMLP) 环境下为 $(0.22 \pm 0.01) \mu\text{m/s}$;在健康人与糖尿病患者中性粒细胞迁移实验对比中,健康人中性粒细胞趋化速度为 $(0.19 \pm 0.01) \mu\text{m/s}$,糖尿病患者中性粒细胞趋化速度为 $(0.15 \pm 0.02) \mu\text{m/s}$;相关性分析表明 II 型糖尿病患者中性粒细胞迁移速度与糖化血红蛋白呈负相关。结论 该文所设计的高通量微流控芯片能快速、稳定地检测细胞的迁移功能,可以作为细胞迁移研究的新工具。

关键词 微流控芯片;中性粒细胞;细胞迁移;II 型糖尿病
中图分类号 R 318.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)04-0581-09
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.011

中性粒细胞的趋化迁移功能在机体抗感染免疫反应中发挥着重要作用^[1-2]。中性粒细胞趋化迁移

信号失调可导致自身免疫性疾病甚至致命危险。微流控芯片技术最早起源于 20 世纪 90 年代,而细胞趋化正是其重要的研究领域之一^[3]。近几年来,各式各样的微流控芯片已被设计应用于研究免疫功能缺陷患者中性粒细胞的趋化性^[4-5]。这些成果奠定了基于微流控芯片的中性粒细胞趋化性分析的理论和技术基础。

通常,基于微流控芯片的细胞趋化性分析需要实时显微镜来记录和跟踪细胞迁移路径。由于显微镜的视场有限,无法在显微镜视场中同时观察芯片中所有的细胞迁移通道^[6-8]。虽然扩大显微镜的数量或旋转/移动物镜可以提高检测通量,但这些方法会增加成本和操作时间^[9-10]。该研究设计了一款环形六阵列微流控芯片,用于研究中性粒细胞的迁移功能表型。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂 中性粒细胞分离试剂盒(货号:19666)和 EasySep 分离磁铁(货号:18000)购于加拿大 STEMCELL 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(货号:PWL001-1)购于大连美仑生物技术有限公司;4%多聚甲醛固定液(货号:ST1127)购于福建居米公司;鬼笔环肽(货号:YP0059S)购于苏州 US EVERBRIGHT 公司;聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)基本组分和固化剂(货号:PDMS184)购于美国 SYLGARD 公司;磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS)(货号:02-024-1ACS)购于以色列 Biological Industries 公司;RPMI-1640 培养基(货号:SH30809.01)购于美国 Cytiva 公司;N-甲酰-L-甲硫氨酰-L-白氨酰-L-苯丙氨酸(N-Formyl-Met-Leu-Phe, fMLP)(货号:F3506)、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)(货号:SRP3311)、Triton X-100(货号:9036-19-5)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-Diamidino-2-phenylindole, DAPI)(货号:D9542-1)、FITC-右旋糖酐(货号:60842-46-8)均购于美国 SIGMA-Aldrich 公司;等离子清洗机(货号:PDC-32G-2)购于美国 Harrick 公司;倒置荧光显微镜(货号:DMI8)购于德国 Leica 公司;CO₂ 恒温细胞

2023-02-24 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31800713);中国科学院青年创新促进会项目(编号:2021442)

作者单位:¹安徽医科大学生物医学工程学院,合肥 230032

²中国科学院合肥物质科学研究院安徽光学精密机械研究所,安徽省生物医学光学仪器工程技术研发中心,安徽省用光学诊疗技术与装备工程实验室,合肥 230031

作者简介:杨道,男,硕士研究生;

朱华庆,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: aydzhq@126.com;

朱灵,男,研究员,硕士生导师,责任作者,E-mail: zhul@aiofm.ac.cn

培养箱(货号: D180) 购于深圳瑞沃德公司。

1.2 微流控芯片设计和制备 使用 SOLIDWORKS 软件设计环形阵列微流控芯片。制备微流控芯片的模具由中国科学技术大学制造。模具包含两层结构, 第一层厚度为 $3\ \mu\text{m}$, 用于形成细胞隔离结构。第二层厚度为 $70\ \mu\text{m}$, 用于形成蛇形微通道、水平压力平衡通道和细胞迁移主通道。模具制作完成后, 将 PDMS 浇注到模具上, 并在 $70\ ^\circ\text{C}$ 下烘烤 2 h。然后将 PDMS 从模具中切割脱模, 并采用打孔器制作各个阵列上的试剂入口和出口。随后, 使用等离子体清洗机对 PDMS 芯片表面进行清洗改性, 与玻璃基板完成键合。芯片制作完成后, 将去离子水注入填充各个阵列上的试剂入口和出口, 以保持微通道的亲水性。随后, 芯片被放入 $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱备用。

1.3 微流控芯片仿真 使用 Comsol Multiphysics 仿真软件对单个细胞迁移主通道中化学浓度梯度生成情况进行模拟。软件中基本仿真参数设置如下: 趋化因子注入口和细胞培养液注入口初始浓度 C1 和 C2 分别为 $1\ \text{mol}/(\text{L}\cdot\text{m}^3)$ 和 $0\ \text{mol}/(\text{L}\cdot\text{m}^3)$, 试剂密度 ρ 为 $10^3\ \text{kg}/\text{m}^3$, 动力黏度 μ 为 $10^{-3}\ \text{Pa}\cdot\text{s}$, 扩散系数为 $7.5\times 10^{-11}\ \text{m}^2/\text{s}$ 。趋化因子注入口和细胞培养液注入口设置为 $70\ \text{Pa}$, 出口压力为 $0\ \text{Pa}$ 。

1.4 微流控芯片前处理 对于中性粒细胞趋化性分析, 在各个管道的出口与入口处注入 $2.5\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 的 Fibronectin 溶液。静置 1 h 后, 再注入细胞培养基 (5% FBS, 经 RPMI-1640 稀释) 包被微通道。

1.5 病例选择及外周血中性粒细胞的分离和培养

1.5.1 病例选择 该研究经中国科学院合肥物质科学研究院伦理委员会批准(编号: Y-2018-21), 通过静脉穿刺从健康供体获得人体血液样本。所有参与者均签署书面知情同意书。病例选择, 要求如下: ① 糖尿病组: 选取 6 例 II 型糖尿病和空腹血糖 $\geq 6\ \text{mmol}/\text{L}$ (体质量指数 $< 30\ \text{kg}/\text{m}^2$) 的受试者。优先考虑空腹血糖 $\geq 6\ \text{mmol}/\text{L}$ 和体质量指数 $< 30\ \text{kg}/\text{m}^2$ 的受试者。如果没有足够的空腹血糖 $\geq 6\ \text{mmol}/\text{L}$ 的受试者, 优先选择空腹血糖水平最高 $\geq 5\ \text{mmol}/\text{L}$ 的候选受试者以填补该队列。② 健康对照队列: 选取 3 名没有诊断为糖尿病和空腹血糖 $< 5\ \text{mmol}/\text{L}$ 没有代谢综合征且体质量指数正常 ($18.5\sim 24.9\ \text{kg}/\text{m}^2$) 的受试者。③ 排除标准: 严重感染、应激、心功能不全、肾功能不全、肝脏损害、急性心脑血管疾病、恶性肿瘤病史、精神障碍; I 型糖尿病、妊娠期糖尿病及其他特殊类型糖尿病; 近期发生糖尿病酮症或酮症酸中毒、高渗性昏迷等糖尿病急性并发症; 近

期内使用过非甾体类抗炎药、维生素 E 等对高敏 C 反应蛋白有影响的药物; 近期严重感染患者、手术经历者或其他应激情况。

1.5.2 中性粒细胞的分离和培养 每人每次采集的静脉血液体积为 2 ml。使用磁性中性粒细胞分离试剂盒直接从血液中分离中性粒细胞。纯化的中性粒细胞悬浮在 4 ml 细胞培养基 (5% FBS) 中, 并用于后续实验。实验需要在 8 h 内完成。

1.6 微流控芯片上细胞趋化性实验操作 该实验操作步骤: ① 将环形阵列微流控芯片的所有试剂入口和出口均清空; ② 将 $10\ \mu\text{l}$ 含有中性粒细胞的培养基加入细胞加载口, 细胞将沿着微通道流入, 随后被细胞隔离结构阻挡并整齐地排列在细胞迁移主通道边缘; ③ 在相应试剂入口分别注入趋化剂和细胞培养基 $100\ \mu\text{l}$, 在显微镜下观察细胞迁移行为。

研究中性粒细胞响应不同趋化因子的趋化行为差异时, 在环形阵列微流控芯片的阵列 1~3 的趋化因子注入口和细胞培养液注入口分别注入 $100\ \text{nmol}/\text{L}$ IL-8 和细胞培养基 $100\ \mu\text{l}$ 。在环形阵列微流控芯片的阵列 4~6 的趋化因子注入口和细胞培养液注入口分别注入 $100\ \text{nmol}/\text{L}$ fMLP 和细胞培养基 $100\ \mu\text{l}$ 。

研究 II 型糖尿病患者与健康志愿者中性粒细胞趋化行为差异时, 设计了 3 个实验序列: ① 健康人 1 与糖尿病患者 1、2; ② 健康人 2 与糖尿病患者 3、4; ③ 健康人 3 与糖尿病患者 5、6。在环形阵列微流控芯片的阵列 1~2 中注入第 1 位 II 型糖尿病患者的中性粒细胞, 在阵列 3~4 中注入第 2 位 II 型糖尿病患者的中性粒细胞, 在阵列 5~6 中注入健康志愿者的中性粒细胞。所有趋化因子注入口和细胞培养液注入口分别注入 $100\ \text{nmol}/\text{L}$ fMLP 和细胞培养基 $100\ \mu\text{l}$ 。

趋化因子注入口和细胞培养液注入口与出口之间的压力差驱动试剂流动, 并在细胞迁移主通道中生成化学引诱剂浓度梯度, 而无需外部泵, 从而简化了分析操作。此外, 当将 $5.0\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 的荧光素溶液添加到趋化剂溶液中时, 可以用于测量细胞迁移主通道的荧光梯度。细胞加载和梯度建立操作完成之后, 将环形阵列微流控芯片置于倒置显微镜的 500 倍视野下, 环境温度设置为 $37\ ^\circ\text{C}$, 并以 6 帧/min 的速率采集细胞迁移主通道中的中性粒细胞迁移图像, 时间为 15 min。通过测量细胞迁移主通道中荧光素溶液的荧光强度分布来检查梯度生成, 并通过 Image J 软件中的 Plot Profile 分析梯度分布。

1.7 细胞迁移数据分析 捕获后的细胞迁移运动图像使用 Image J 软件中的 Manual Tracking 功能手动获取单个中性粒细胞的迁移运动轨迹数据。追踪细胞运动轨迹起始点始于细胞穿过细胞隔离结构的时刻(图 1A)。每个阵列的细胞迁移主通道中需要追踪 30 个细胞。通过计算平均速度 (V) 来评估中性粒细胞的迁移运动能力。如图 1B 所示, V 为总迁移距离与实验时间的比值 (L/t)。此外, 还将 15 min 细胞迁移时间分割成 10 份, 计算了中性粒细胞随时间变换的 $V_i (i=1, 2, \dots, 10)$, 以观测细胞迁移运动过程中的细胞迁移运动变化情况(图 1C)。

1.8 细胞形态学观察 待细胞完成迁移运动后, 清空各管道口内液体。注入 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, 使用 0.5% Triton X-100 (PBS 配置) 对细胞进行透化处理 10 min; 随后, 使用 5 T/ml (T: 染色一个加载细胞的载玻片所用染料的量) 鬼笔环肽 (绿色,

PBS 配置) 染色 5 min; 最后注入 1.5 $\mu\text{mol/L}$ DAPI (蓝色, PBS 配置) 染色 5 min。上述步骤结束时, 均需要将管道口内液体吸出, 使用 PBS 清洗管道 3 次, 每次 5 min。在 2 000 倍荧光显微镜下观察并捕获图像。随后, 使用 Image J 软件中的 Measure 计算中性粒细胞的长宽比。长宽比计算为最佳拟合椭圆的长轴与短轴之比。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析, 进行正态性检验。计量资料实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。单变量两组资料之间的比较采用 Student t 检验; 多组均数的比较采用单因素方差分析, Pearson 检验分析双连续变量的相关性, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 环形阵列微流控芯片表征 环形阵列微流控

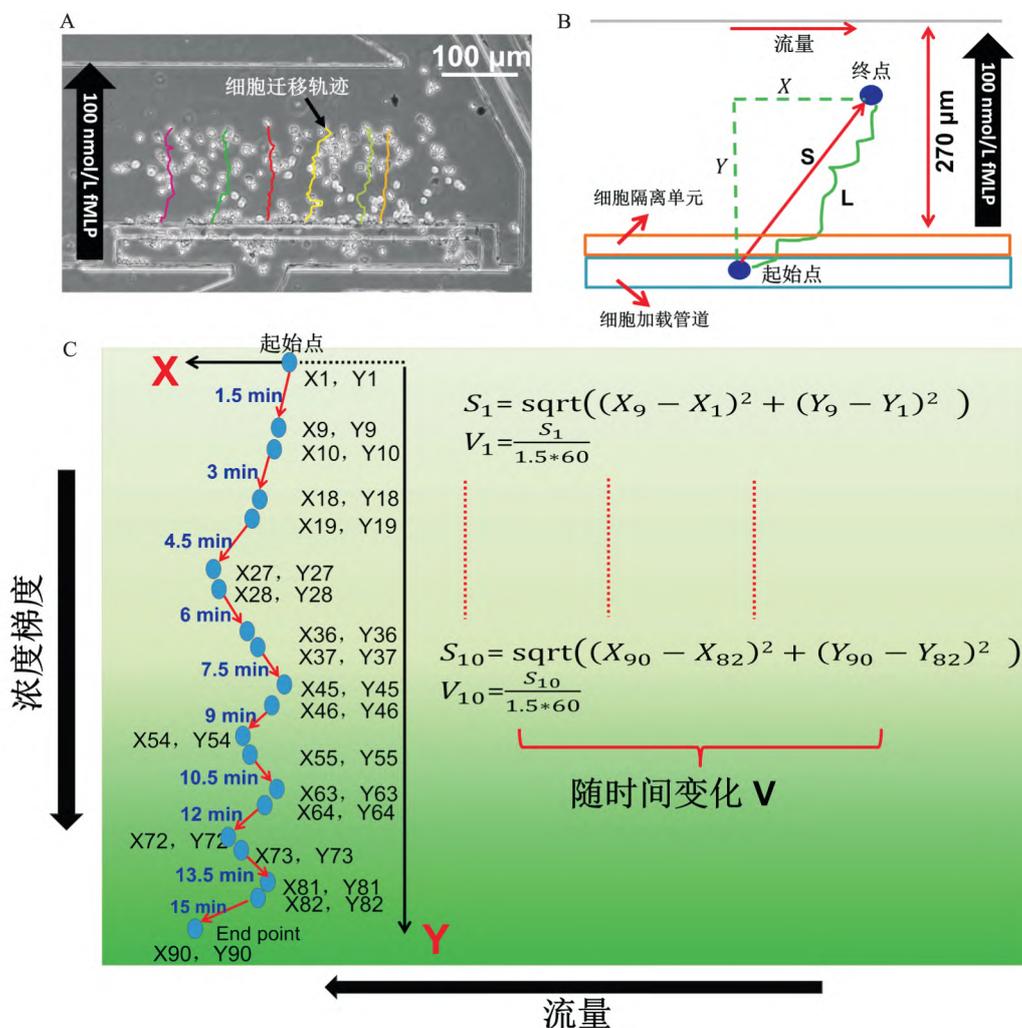


图 1 环形阵列微流控芯片的细胞迁移主通道中的中性粒细胞趋化性分析方法
A: 2 000 倍视野下单管中性粒细胞迁移情况; B: 迁移速度定义; C: 1.5 min 内细胞平均迁移速度定义

芯片包括: PDMS 芯片主体和玻璃基板(图 2A、B)。PDMS 芯片主体上设计有呈环形分布的六组阵列, 每组阵列的结构设计一致, 含有蛇形微通道、细胞迁移主通道、细胞隔离结构。每组阵列还设计有细胞加载口、趋化因子注入口、细胞培养基注入口、废液口(图 2C)。其中, 蛇形微通道高度为 $70\ \mu\text{m}$, 宽度为 $80\ \mu\text{m}$; 细胞迁移主通道高度为 $70\ \mu\text{m}$, 宽度为 $270\ \mu\text{m}$; 细胞隔离结构高度为 $3\ \mu\text{m}$, 宽度为 $20\ \mu\text{m}$ 。细胞加载口与细胞隔离结构、细胞迁移主通道连通。中性粒细胞从细胞加载口注入后, 在细胞隔离结构处被格挡, 整齐排列在细胞迁移运动主通道的边缘。趋化因子注入口和细胞培养基注入口分别与上游两条蛇形微通道相连。当注入等体积的趋化因子和细胞培养基后, 在不需要外部机械泵的条件下, 依靠层流和扩散机制在下游细胞迁移主通道内产生稳定的浓度梯度(图 2E、F)。两条蛇形微通道之间还设计

有压力平衡通道, 用于平衡趋化因子注入口和细胞培养基注入口的试剂压差。中性粒细胞感受到细胞迁移主通道的趋化因子后, 将发生极化形变从而穿过细胞隔离结构, 并在细胞迁移主通道中发生定向迁移运动(图 2D)。趋化因子和细胞培养基将从废液口排出。为验证六组阵列的细胞迁移主通道中浓度梯度的稳定性和一致性, 每隔 $15\ \text{min}$ 采集了显微镜成像区域中细胞迁移主通道浓度梯度(图 3)。结果显示, 每个阵列在同一时刻的浓度梯度曲线形状基本一致。各个阵列的在不同时间内的浓度梯度曲线基本一致。各个阵列的浓度梯度曲线可稳定保持至少 $75\ \text{min}$ 。

2.2 微流控芯片表征中性粒细胞对常用化学引诱剂的趋化性 通过测试中性粒细胞对不同类型趋化剂 IL-8 和 fMLP 在同等浓度下 ($100\ \text{nmol/L}$) 的趋化反应来验证开发的微流控芯片。结果显示, IL-8

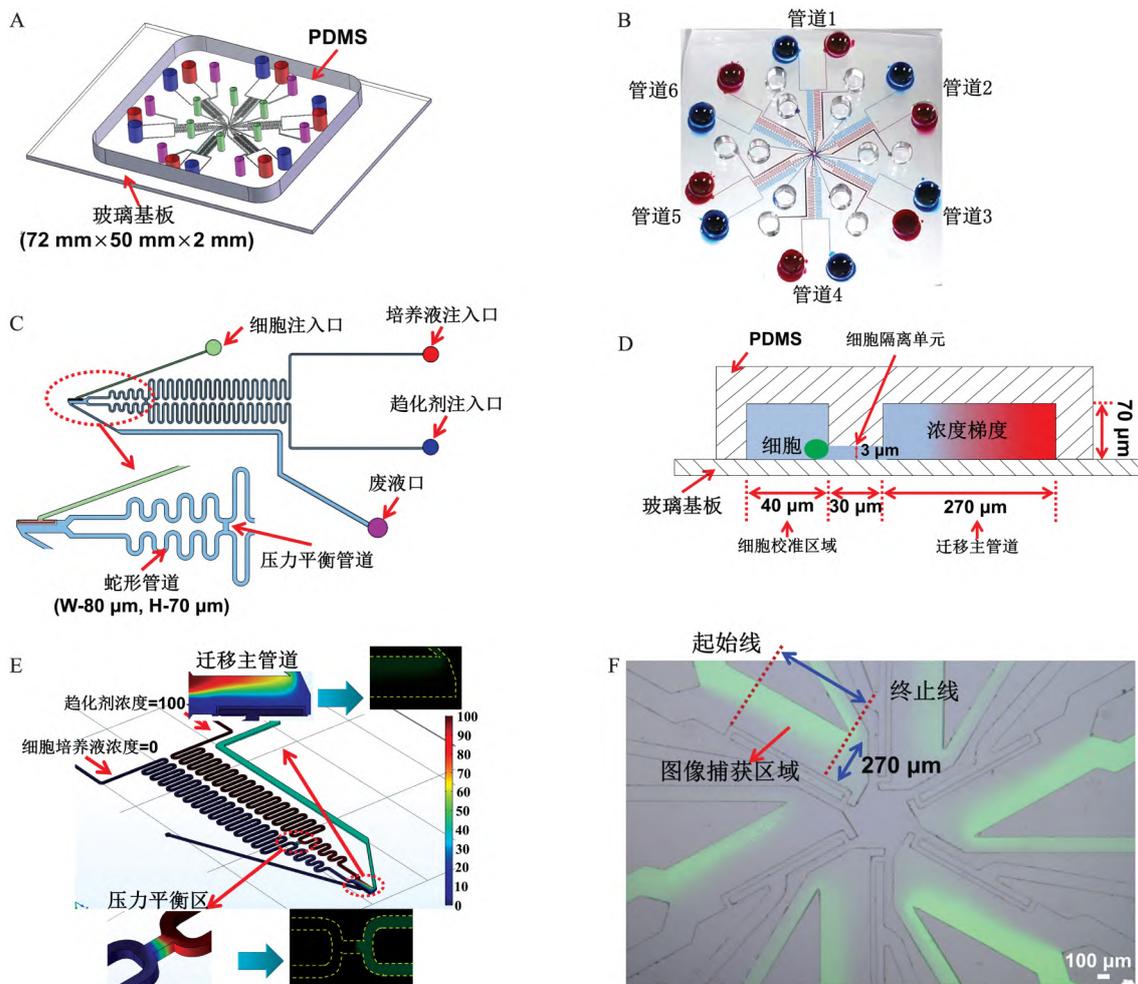


图 2 环形阵列微流控芯片结构示意图

A: 环形阵列微流控芯片的等轴侧视图; B: 环形阵列微流控芯片的前视图(照片); C: 单个阵列结构示意图; D: 细胞隔离结构的切面视图; E: 利用 Comsol Multiphysics 对单个阵列的仿真的流量热图, 包括细胞迁移主通道中的压力平衡通道处的仿真和实际梯度图像; F: 置于 500 倍显微镜视场下的六个细胞迁移主通道中的荧光图像

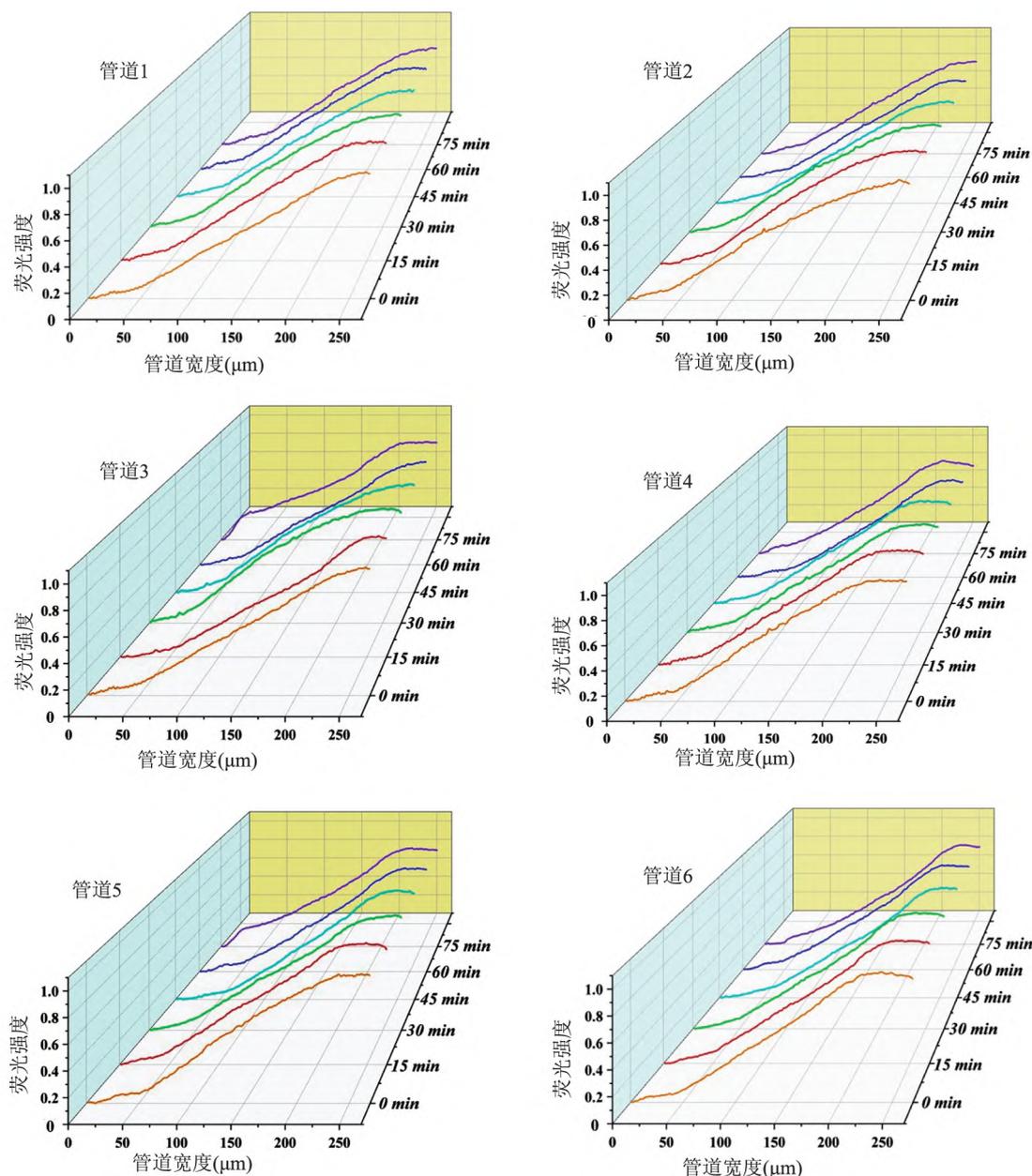


图3 环形阵列微流控芯片的六个细胞迁移主通道中0~75 min内的实时荧光梯度曲线

和 fMLP 都刺激了中性粒细胞,使其产生向高浓度移动的迁移反应(图 4A)。对单个细胞分析显示,IL-8 环境下中性粒细胞平均迁移速度为 $(0.21 \pm 0.01) \mu\text{m/s}$, fMLP 为 $(0.22 \pm 0.01) \mu\text{m/s}$ (图 4B)。

如图 4C 和 D 所示,在 fMLP 梯度中,细胞骨架重新排列,细胞发生极化形变,较宽的前部显示的“前缘/伪足”带动细胞向前运动,后部显示的“尾端”使细胞能够沿着浓度梯度方向迁移运动。相比之下,在 IL-8 梯度中,并未出现明显的骨架极化状态,细胞形态较为细窄。在这两种情况下,细胞的前缘都朝向梯度方向。图 4E 显示了不同趋化剂中细

胞的长宽比。通过随机测量 15 个细胞, fMLP 和 IL-8 中细胞的长宽比分别为 (1.25 ± 0.18) 和 (1.82 ± 0.35) (图 4F)。以上数据表明,本文设计的微流控芯片在相同浓度、不同种类趋化剂的条件下测量中性粒细胞趋化性方面得到了成功验证。

2.3 微流控芯片表征糖尿病患者中性粒细胞的趋化性 在微流控芯片上,首先观察到 6 位 II 型糖尿病患者中性粒细胞的表现出一致的迁移速度降低,如图 5A、C、E 所示,健康人趋化速度为 $(0.19 \pm 0.01) \mu\text{m/s}$,糖尿病患者趋化速度为 $(0.15 \pm 0.02) \mu\text{m/s}$ 。此外,进一步的研究显示,健康对照组的中

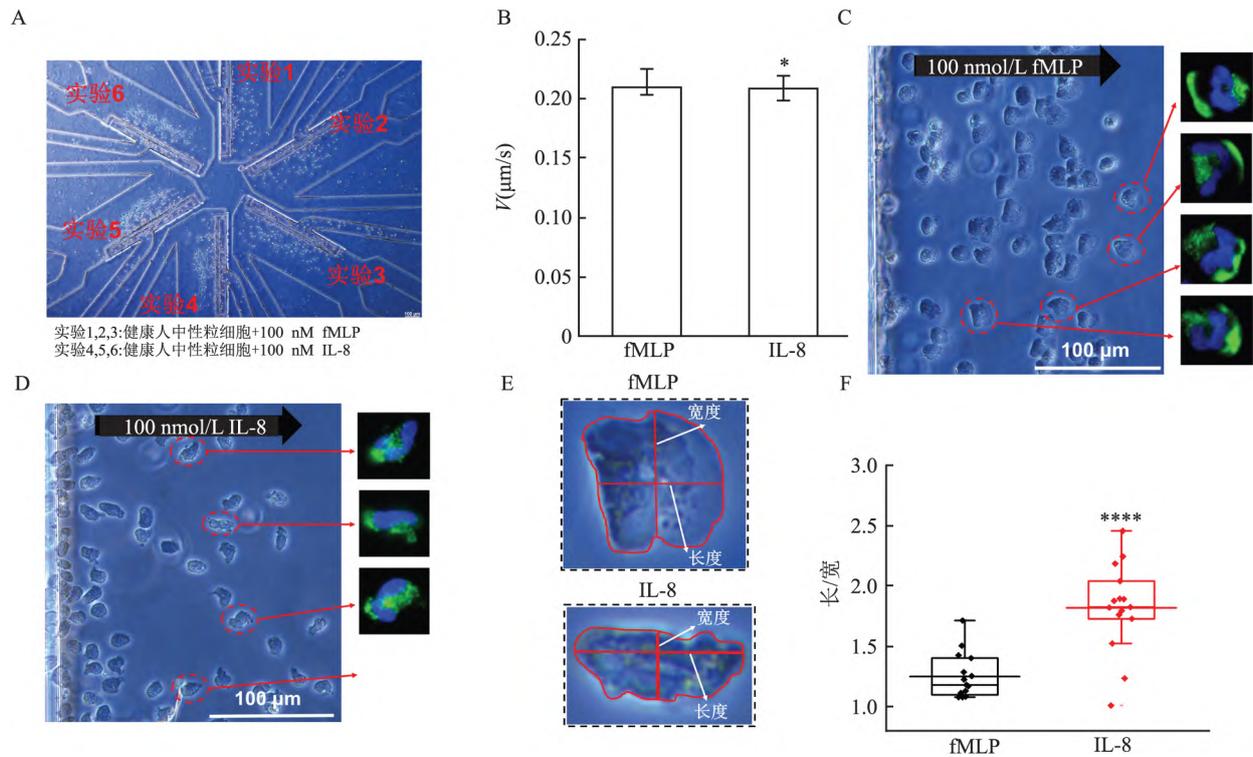


图4 IL-8 与 fMLP 对中性粒细胞趋化反应对比

A: 500 倍视野下中性粒细胞在不同趋化剂环境下趋化反应实验设计; B: 图 A 趋化距离实验结果; C: 中性粒细胞在 100 nmol/L fMLP 梯度下形态; D: 中性粒细胞在 100 nmol/L IL-8 梯度下形态; E: 不同趋化剂下的细胞长宽比; F: IL-8 与 fMLP 细胞长宽比对比数据; 与 fMLP 细胞组比较: * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$

表1 糖尿病患者部分生理指标

样本	年龄 (岁)	患病时间 (年)	V ($\mu\text{m/s}$)	HbA1c (%)	WBC ($\times 10^9$)	NEUT% (%)	ANC ($\times 10^9$)
患者1	55	12	0.14	7.80	10.72	74.00	7.93
患者2	53	15	0.14	6.80	6.27	64.00	4.02
患者3	36	7	0.15	14.10	9.05	71.00	6.38
患者4	53	10	0.13	8.50	4.80	50.00	2.40
患者5	54	8	0.17	7.00	8.29	72.00	5.94
患者6	45	13	0.16	6.00	5.32	54.00	2.85
平均值	49	11	0.15	8.37	7.41	64.17	4.91

性粒细胞随时间变化的 V_i 值大多情况下都高于患者 (图 5B、D、F)。并且健康人及糖尿病患者的中性粒细胞 V_i 值均会先上升到一定阈值之后,就会随时间推移而逐渐衰减。如表 1 所示,同步比较 6 例患者的部分临床指标与总体迁移速度的相关性 (Pearson 相关性分析): 糖化血红蛋白 (HbA1c)、白细胞计数 (white blood cell, WBC)、中性粒细胞百分比 (neutrophils%, NEUT%) 和中性粒细胞绝对值 (absolute neutrophil count, ANC)。其中, 1 代表完全线性正相关, -1 代表完全线性负相关, 0 代表不相关。结果显示, NEUT% (0.33) > ANC (0.18) > WBC (0.16) > HbA1c (-0.15), 提示患者中性粒细

胞的迁移速度与上述生理指标并未呈现出很大的相关性,且多数生理指标与中性粒细胞趋化速度之间的趋势均为正相关,仅 HbA1c 为负相关。这表明 II 型糖尿病患者的炎症、代谢状态和中性粒细胞运动功能之间可能存在关联 (图 6)。

3 讨论

目前使用最广泛的趋化实验是 Transwell/Boyden 小室,其小室内细胞在化学吸引剂或血清存在的情况下自上而下地迁移穿过微孔膜,然后通过计数下层液体中细胞以确定迁移情况。然而,实验过程中,此方法无法对细胞迁移过程进行实时观察研究,量化迁移变化。本文设计的基于微流控芯片的趋化试验表征了中性粒细胞的迁移速度,测得的趋化性表型基于平均或大量中性粒细胞迁移行为,这不需要昂贵的延时成像显微镜系统,并提供了每次进行多重趋化性测定的可能性。

在这项工作中,本文开发了一款集成了蛇形微通道、水平压力平衡通道等特征的微流控芯片,用于定量分析中性粒细胞趋化性。实现了芯片内细胞的富集、定位与趋化功能表型分析。首先,使用健康志

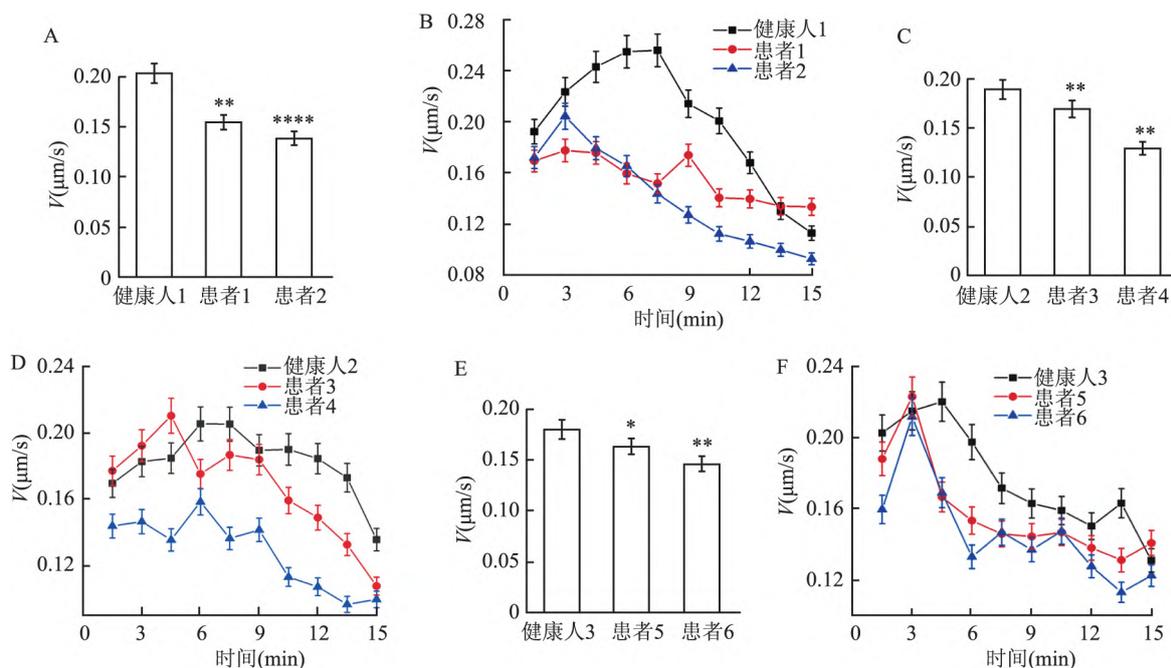


图5 糖尿病患者与健康人趋化行为对比分析

A: 健康人1与糖尿病患者1、2的整体迁移速度对比; B: 在15 min内,健康人1与糖尿病患者1、2的连续Vi对比; C: 健康人2与糖尿病患者3、4的整体迁移速度对比; D: 在15 min内,健康人2与糖尿病患者3、4的连续Vi对比; E: 健康人3与糖尿病患者5、6的整体迁移速度对比; F: 在15 min内,健康人3与糖尿病患者5、6的连续Vi对比; 与健康人组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

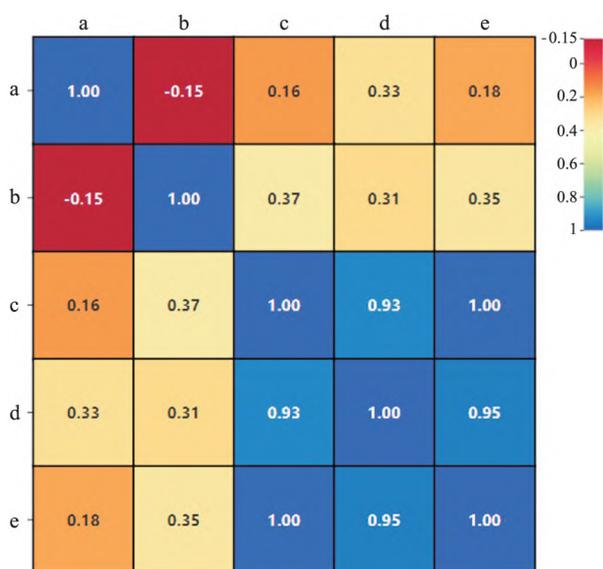


图6 细胞迁移速度与部分生理指标相关性分析
a: V; b: HbA1c; c: WBC; d: NEUT%; e: ANC

愿者血液中分离的中性粒细胞在不同类型趋化剂下 (100 nmol/L fMLP 和 100 nmol/L IL-8) 的趋化反应验证了芯片的基本性能,证明了在相同浓度下,不同类型的趋化剂导致中性粒细胞骨架的不同改变。随后,对健康人与II型糖尿病患者中性粒细胞趋化功能进行对比,结果显示,与3例健康人相比,6例患

者均表现趋化速度降低,这与既往的研究^[11]结果一致。有研究^[12]表明,葡萄糖通过其代谢,改变中性粒细胞的运动形状,从而降低中性粒细胞运动,这种葡萄糖诱导的中性粒细胞趋化反应抑制可能与糖尿病患者中性粒细胞功能缺陷有关,并且由于长时间暴露于高浓度葡萄糖环境导致通过中性粒细胞中的fMLP所对应的趋化因子受体FPR传导性能受损,最终导致糖尿病患者的中性粒细胞趋化性降低和中性粒细胞运输延迟^[13]。也有研究^[9]表明,葡萄糖在人体中的代谢产物AGEs在较高浓度时也会抑制中性粒细胞的趋化反应。该研究结果表明无论健康人还是糖尿病患者,其在15 min内的迁移速率均上升至最大速率后逐渐降低,推测可能是当中性粒细胞在进入低浓度趋化因子梯度环境时,细胞膜表面的趋化因子受体蛋白逐渐被吸引激活,细胞趋化反应逐渐上升,而当趋化因子浓度不断升高,逐渐减少的受体蛋白难以吸收过量趋化因子占据导致细胞的迁移反应不断降低^[14]。随后通过与患者生理参数进行Pearson相关性分析显示,II型糖尿病患者中性粒细胞的趋化功能与NGSP为负相关,提示糖尿病患者的中性粒细胞趋化功能缺陷可能与的异常炎症和代谢状态有关。

综上所述,该研究开发了一种新型微流控装置,

用于多路复用地进行中性粒细胞功能表型分析,相较于传统细胞迁移研究,该技术的关键特征在于:六个相同微管道独立设置实验,提供可靠数据;蛇形管道设计与微管道可以在长时间内提供稳定的线性浓度梯度;在芯片内的细胞在 3 μm 的细胞隔离单元处富集与定位后即可直接进行中性粒细胞功能表型分析。多通道的设计及手动追踪细胞迁移轨迹模式的设定,对于细胞迁移数据的量化仍较为复杂,该研究为基于微流控技术的细胞趋化性研究提供芯片设计思想和方法参考。

参考文献

- [1] Ajendra J. Lessons in type 2 immunity: neutrophils in helminth infections [J]. *Semin Immunopathol*, 2021; 53: 101531.
- [2] 董晓玉,马晴晴,殷俊,等. 血清 IL-6 与中性粒细胞表型及吞噬力关系在脓毒症分期中的诊断价值 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(8): 1265-70.
- [3] Dou J, Mao S, Li H, et al. Combination stiffness gradient with chemical stimulation directs glioma cell migration on a microfluidic chip [J]. *Anal Chem*, 2020, 92(1): 892-8.
- [4] Ellett F, Jorgensen J, Marand A L, et al. Diagnosis of sepsis from a drop of blood by measurement of spontaneous neutrophil motility in a microfluidic assay [J]. *Nat Biomed Eng*, 2018, 2(4): 207-14.
- [5] Yang K, Wu J, Peretz-Soroka H, et al. Mkit: a cell migration assay based on microfluidic device and smartphone [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 99: 259-67.
- [6] Berthier E, Surfus J, Verbsky J, et al. An arrayed high-content chemotaxis assay for patient diagnosis [J]. *Integr Biol*, 2010, 2(11-12): 630-8.
- [7] Wu J, Kumar-Kanojia A, Hombach-Klonisch S, et al. A radial microfluidic platform for higher throughput chemotaxis studies with individual gradient control [J]. *Lab Chip*, 2018, 18(24): 3855-64.
- [8] Deng Y, Davis S P, Yang F, et al. Microfluidics: inertial microfluidic cell stretcher (iMCS): fully automated, high throughput, and near real-time cell mechanotyping [J]. *Small*, 2017, 13(28): 10.
- [9] Yang K, Yang X, Gao C, et al. A novel microfluidic device for the neutrophil functional phenotype analysis: effects of glucose and its derivatives AGEs [J]. *Micromachines*, 2021, 12(8): 944.
- [10] 李慧来,杨道,吴晓松,等. 多通道微流控芯片的设计、仿真及细胞迁移应用研究 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2022, 39(1): 128-38.
- [11] Huang J, Xiao Y, Zheng P, et al. Distinct neutrophil counts and functions in newly diagnosed type 1 diabetes, latent autoimmune diabetes in adults, and type 2 diabetes [J]. *Diabetes Metab*, 2019, 35(1): e3064.
- [12] Oldenburg P A, Sehlin J. D-glucose but not insulin reduces N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMet-Leu-Phe)-induced shape changes in suspended human neutrophils [J]. *Biosci. Rep*, 1997, 17(5): 475-86.
- [13] Spiller F, Carlos D, Souto F O, et al. α 1-Acid glycoprotein decreases neutrophil migration and increases susceptibility to sepsis in diabetic mice [J]. *Diabetes*, 2012, 61(6): 1584-91.
- [14] Blackwood R A, Hartiala K T, Kwok E E, et al. Unidirectional heterologous receptor desensitization between both the fMLP and C5a receptor and the IL-8 receptor [J]. *J Leukoc Biol*, 1996, 60(1): 88-93.

Development and application of integrated high-throughput microfluidic cell migration chip

Yang Xiao¹, Yang Ke², Gao Chaoru¹, Zhu Huaqing¹, Zhu Ling²

¹*School of Biomedical Engineering, Anhui Medical University, Hefei 230032;* ²*Anhui Institute of Optics and Precision Mechanics, Hefei Institute of Physical Sciences, Chinese Academy of Sciences, Anhui Institute of Biomedical Optical Instrument Engineering and Technology R&D Center, Anhui Provincial Laboratory of Medical Optical Diagnosis and Treatment Technology and Equipment, Hefei 230031)*

Abstract Objective To solve the problems of low throughput of current cell migration research methods, which was difficult to establish a stable concentration gradient and observe cell migration behavior in real time, a six-channel array microfluidic chip was designed in this paper. **Methods** In this paper, a six-channel array microfluidic chip is designed. Firstly, multiphysics modeling and numerical simulation were performed using the finite element analysis software COMSOL Multiphysics 5.5 to analyze the flow behavior of the main pipeline of cell migration. Then, the throughput advantage of the device was verified by testing the chemotaxis response of healthy human neutrophils to different types of chemokine gradients in this microfluidic chip. Subsequently, by analyzing the migration rate of neutrophils in 6 patients with type II diabetes mellitus and 3 healthy people, the clinical applicability of the

网络出版时间: 2023-03-28 13:09:29 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20230328.1032.012.html>

小鼠原代海马神经元培养方法优化及 HT22-GRK2^{-/-} 细胞构建

郭梦慧 薛娜娜 袁溪 孟浅 魏伟

摘要 目的 探究并优化新生小鼠海马神经元体外原代培养方法; 构建小鼠海马神经元 HT22 细胞中 G 蛋白偶联受体激酶 2 (GRK2) 基因敲除细胞株 (HT22-GRK2^{-/-})。方法 为优化小鼠原代海马神经元的培养, 取新生 1~2 d C57BL/6J 小鼠海马组织, 经胰酶消化后吹打形成细胞悬液, 于 Neurobasal-A 培养基中加细胞培养添加剂维持细胞生长。利用 CRSIPR/Cas9 基因编辑技术构建 HT22-GRK2^{-/-} 细胞株, 并通过免疫荧光染色和 Western blot 检测 GRK2 敲除效率。结果 以 3×10^7 /孔密度接种的新生小鼠原代海马神经元以无血清培养方式接种于 6 孔板中, 可获得纯度高、活性好的小鼠原代海马神经元细胞; HT22-GRK2^{-/-} 细胞株构建成功。结论 成功建立并优化小鼠海马神经元体外原代培养方法, 利用 CRSIPR/Cas9 基因编辑技术成功构建 HT22-GRK2^{-/-} 细胞株。

关键词 海马神经元; 原代培养; HT22; GRK2; CRSIPR/Cas9

中图分类号 R 329.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)04-0589-08
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.012

海马位于颞叶内侧, 是支持记忆编码、巩固和检索的大脑网络中心, 并且海马在压力、焦虑和抑郁等情绪的调节中起到关键作用^[1]。培养的海马神经元用于体外模拟实验, 其新生、增殖、分化和凋亡等过程的异常与许多疾病的发生密切相关, 如阿尔兹海默病、抑郁症等^[2]。小鼠原代海马神经元和 HT22 细胞系均是体外实验的良好细胞模型。目前大部分研究使用含血清的培养基进行培养, 而血清会激发胶质细胞生长, 降低神经元的纯度和存活率^[3], 亟待进一步优化。

G 蛋白偶联受体激酶 2 (G-protein-coupled receptor kinase 2, GRK2) 是一种多功能的蛋白, 正常生理状态下, GRK2 主要位于细胞质, 调控 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 的脱敏、复敏和调节多种信号分子。GRK2 在大脑中广泛表达, 调节神经元信号转导和中枢神经系统疾病的发生发展^[4-5]。通过 CRSIPR/Cas9 基因编辑技术对细胞和生物体内的基因进行编辑, 修改生物体内的遗传物质。目前有关 GRK2 参与调控中枢神经系统疾病发生的机制尚无报道。本实验将选用 HT22 细

2023-02-11 接收

项目基金: 国家自然科学基金(编号: 82101311、81973332)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 安徽省抗炎免疫药物协同创新中心, 合肥 230032

作者简介: 郭梦慧, 女, 硕士研究生;

孟浅, 女, 博士, 副教授, 责任作者, E-mail: mengqian@ahmu.edu.cn;

魏伟, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

annular six-channel array microfluidic chip was further verified. Finally, the Pearson coefficient was used to analyze the correlation between neutrophil chemotaxis function and some physiological indicators in patients with diabetes.

Results The concentration gradient data inside the pipeline simulated by the simulation software was compatible with the real-time fluorescence test data of the pipeline. The average migration rate of healthy human neutrophils was $(0.21 \pm 0.01) \mu\text{m/s}$ in 100 nmol/L interleukin-8 (IL-8) environment and $(0.22 \pm 0.01) \mu\text{m/s}$ in 100 nmol/L N-Formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) environment. In the comparison of neutrophil migration experiments between healthy people and diabetic patients, the chemotaxis rate of neutrophils in healthy people was $(0.19 \pm 0.01) \mu\text{m/s}$, and the neutrophil chemotaxis rate in diabetic patients was $(0.15 \pm 0.02) \mu\text{m/s}$. Correlation analysis showed that neutrophil migration rate in patients with type II diabetes mellitus was inversely correlated with glycosylated hemoglobin. **Conclusion** The high-throughput microfluidic chip proposed in this paper allowed rapid and selective detection of cell migration characteristics at the single-cell level, and it could be used as a new tool for cell migration research.

Key words microfluidic chip; neutrophils; cell migration; type II diabetes