基于微流控芯片的细胞迁移

刘雯婷^{①②}, 陈红梅^{①*}, 聂富强^{①*}

① 中国科学院苏州纳米技术与纳米仿生研究所, 苏州 215123;

② 中国科学院大学, 北京 100049

* 联系人, E-mail: hongmeichen@semi.ac.cn; fqnie2012@sinano.ac.cn

2015-09-14 收稿, 2015-10-22 修回, 2015-10-29 接受, 2015-12-21 网络版发表

国家自然科学基金(21071148, 21271182)和中国博士后科学基金(2014M550794)资助

摘要 细胞迁移在血管再生、伤口愈合、炎症反应、胚胎发育等多种生理和病理过程中起到关键作用. 细胞迁移研究中, 传统的研究方法无法满足高通量的需求, 且大多是单因素检测, 难以综合考虑细胞基质、浓度梯度等多参数对细胞迁移的影响. 微流控芯片分析是当前的科技前沿领域之一, 其作为细胞迁移研究新的技术平台, 一方面具有集成度高、灵敏度高、高通量、试剂消耗少等优势, 快速实现大规模分析; 另一方面芯片中微米级的通道结构可精确控制物质浓度梯度和微流体, 调节溶液温度和pH等细胞微环境要素, 更真实模拟细胞体内生长微环境, 并完成实时监测. 微流控芯片已经被广泛应用于细胞迁移研究, 其模型分为二维(2D)和三维(3D)两大类, 分别从平面培养和立体生长的角度, 研究不同因子浓度梯度、电刺激或细胞间相互作用等条件对细胞迁移行为的影响, 打破了传统方法的局限性, 促进了生物及医学等领域的研究. 本文介绍了微流控芯片在细胞迁移研究中的最新进展, 重点综述了研究细胞迁移的2D和3D微流控芯片, 并讨论了各类微流控芯片的优缺点.

关键词 微流控芯片, 细胞迁移, 伤口愈合, 浓度梯度, 趋电性, 二维, 三维

细胞迁移是一个受大量化学和物理信号指导的动态复杂过程, 在众多生理、病理过程中扮演着重要角色^[1]. 细胞迁移能否正常调控直接影响正常生理功能, 如在癌症治疗过程中, 癌细胞的侵袭转移成为癌症治疗预后性差的主要原因; 在伤口愈合过程中, 成纤维细胞活化迁移能加快伤口愈合. 不同的环境将影响细胞迁移形式, 如在免疫反应中, 免疫细胞受趋化因子影响而向感染灶迁移; 在二维(2D)环境中细胞迁移有个体迁移和群体迁移, 在三维(3D)环境中细胞迁移主要为间充质迁移和阿米巴迁移. 为了更好地探究免疫反应、肿瘤细胞迁移机制等多种生理和病理过程, 筛选抑制肿瘤细胞迁移药物, 实现伤口快速、无疤痕愈合等多种生物医学需求, 细胞迁移成为细胞生物学研究的一个重要方向.

传统的细胞迁移研究方法有划痕法^[2]、诱导扩散法^[3]、Boyden小室^[4]/Transwell小室^[5]等, 但这些方法操作复杂、试剂消耗较多, 且灵敏度有待提高, 划痕法形成的伤口重现性低, Transwell小室建立的浓度梯度不稳定, 难以实时观察. 随着人们对伤口完美愈合和癌症等疑难疾病治愈的急切需求, 传统的细胞迁移实验技术已不能满足这种需求, 也难以短时间内获得大量生物信息; 同时, 传统方法大多是在单因素条件下检测细胞迁移情况, 使细胞迁移的研究呈现瓶颈状态.

微流控芯片技术有望解决这些难题, 可摆脱多孔板实验中边缘效应的干扰, 精确控制物质浓度、溶液温度和pH等细胞微环境要素, 精确地模拟生物体内环境. 微流控芯片技术以分析化学为基础, 以网络

引用格式: 刘雯婷, 陈红梅, 聂富强. 基于微流控芯片的细胞迁移. 科学通报, 2016, 61: 364–373

Liu W T, Chen H M, Nie F Q. Cell migration with microfluidic chips (in Chinese). Chin Sci Bull, 2016, 61: 364–373, doi: 10.1360/N972015-01055

微管道为结构特征,集生物学、化学、医学实验室基本功能和操作单元于一块芯片上,实现自动化的快速分析方法,具有微型化、集成化、高通量等优点,为动态生物分析提供了一个崭新的技术平台^[6,7],逐渐发展起来的微流控芯片技术已在医学、生命科学等众多科学领域展示了前所未有的发展潜力和应用价值^[8-10].微流控芯片应用于细胞迁移研究,具有独特优势^[11]:(1)微米级通道与细胞尺寸相当,适合细胞培养,且细胞和试剂等资源消耗少;(2)多维网络式通道结构,能精确控制物质浓度、温度和pH等要素模拟细胞真实生长环境;(3)满足高通量分析需要;(4)多操作单元灵活组合,可将细胞迁移与细胞的捕获、分类筛选、细胞间相互作用等其他细胞研究集成在一张芯片上.

各类细胞迁移研究模型如图1所示,基于微流控芯片的细胞迁移研究模型根据其培养方式可分为2D和3D 2大类^[12-16].目前,多数体外细胞实验都是将细胞附着在处理过的材料表面,即2D培养模式,进而研究细胞的生长、迁移等机制,这类方法简便、快速,但需要贴壁生长的细胞,模拟细胞体内生长环境能力较差^[17];3D研究模式一般利用水凝胶或胶原蛋白构建支架结构,甚至在支架结构中参杂可溶性生长因子或细胞因子等模拟细胞生长微环境,这类方法生物相关性好,但是操作相对复杂^[18].本文将从这2种类型综述基于微流控芯片的细胞迁移研究进展.

1 基于微流控芯片的2D细胞迁移

基于微流控芯片2D模式的细胞迁移可分为伤口愈合类细胞迁移与无伤口类细胞迁移2类:伤口愈合类细胞迁移指细胞培养形成单层后,采用机械损伤法、物理障碍法、化学法、光电学法等^[19]外力作用,使

单层细胞出现离断或缺损的伤口区域,进而研究伤口愈合过程中的细胞迁移;无伤口类细胞迁移即不形成伤口,通过一定刺激如化学药物或电信号诱导细胞迁移^[20].

1.1 伤口愈合类细胞迁移

微流控芯片中的用于研究细胞迁移的伤口愈合模型有胰蛋白酶消化类^[21]、物理阻隔类^[22]、电阻抗表征类^[23],如图2所示.

(i) 胰蛋白酶消化. 2007年, Nie研究组^[21,25]首次利用微流体在微通道中层流现象,建立了细胞伤口愈合模型.芯片的3个分支通道一端汇合到1个主通道,另一端连接各自的进样口,将胰蛋白酶与磷酸盐缓冲液(PBS)分别从分支通道进入主通道后形成3股平行不混合的流体,胰蛋白酶流经的细胞脱落而PBS流经的细胞维持贴壁状态,从而获得规则整齐的细胞伤口区域,用于研究多种生物因子(表皮细胞生长因子EGF、细胞松弛素、鬼笔环肽)对NIH-3T3成纤维细胞迁移的影响.该芯片操作简单高效,流体剪切力形成的伤口边缘整齐,避免了传统划痕实验中对伤口细胞的物理损害(图2(a)),为细胞伤口愈合研究开辟了新途径.在此基础上, van der Meer等人^[26]在此类芯片模型中建立持续可控的微流体,模拟血管内血液流动,考察了细胞在剪切力作用下的迁移速率;同时产生稳定的物质浓度梯度,打破了传统方法如Boyden小室形成的浓度梯度不可控的局限性.然而,该实验没有进一步分析不同剪切力及伤口大小对细胞迁移的影响,微流体在层流条件下建立的浓度梯度无法量化. Conant等人^[27]则将24孔板与Y型微流控芯片耦合,在每个孔内集成8条微通道,每个通道内设9个观测点,并与商业化的BioFlux系统相结

图1 (网络版彩色)细胞迁移研究模型

Figure 1 (Color online) Schematics of different models for cell migration assays

图2 (网络版彩色) 伤口愈合类细胞迁移研究的微流控芯片. (a) 层流示意图及伤口模型^[21]; (b) 阵列阻隔伤口愈合芯片^[22]; (c) 微柱阻隔芯片^[24]; (d) ECSI伤口愈合芯片^[23]

Figure 2 (Color online) Schematics of microfluidic chips for cell migration in wound healing. (a) Visualized laminar flow profiles and the formed wound edge^[21]; (b) an actual blank-fill chip^[22]; (c) wound created by removing pillar block in a chip^[24]; (d) ECSI device for the cell migration assay^[23]

合, 创建了基于微流控芯片全自动控制的细胞伤口愈合模型, 考察了EGF等因子对鼠肺上皮细胞迁移与扩散的影响, 实现了全自动及伤口高度一致的模型制作和实时观察. 随着控制条件的不断优化, 这类伤口模型在研究细胞因子或药物对细胞迁移影响等方面获得了较大的发展^[28,29]; 但关于研究多种细胞相互作用条件下的迁移报道较少, 在单个微通道内形成单层细胞时, 将2种细胞分开培养存在一定局限性, 形成伤口后也难以区分多种细胞各自的迁移状态.

(ii) 物理阻隔. 阻隔法通过在细胞形成单层过程中设置阻隔物, 形成单层后再移除, 根据阻隔物的形状可形成不同尺寸、形状和大小的伤口^[30-32]. Zheng等人^[22]在微流控芯片中设计了阵列式阻隔型细胞伤口愈合模型(图2(b)), 检测到因敲除HDAC7及相关基因导致人静脉内皮细胞迁移速率降低. 该芯片微通道中含有阵列微阀作为阻隔柱, 其尺寸稍微比微通道小, 在细胞植入微通道前关闭微阀, 使微阀与底层接触阻碍细胞生长, 细胞在微通道中生长成单层后, 释放微阀, 与微阀形状对应的细胞伤口相应形成, 再通过显微镜观察伤口愈合过程中的细胞迁移. 该方法实现了细胞迁移实验的定量及高通量检测, 大大缩短了实验时间, 且巧妙地结合氧化铟锡导电玻璃(ITO), 实现细胞恒温培养. Sung等人^[33]利用胶带阻隔法设计出电场刺激下的细胞伤口愈合模型(ESWHC), 研究伤口愈合速率对血清和电场的依赖性. 芯片含电刺激微通道和细胞培养室, 在培养室内放置胶带产生细胞伤口, 集合了电刺激系统、热控制

系统、泵系统及成像系统, 充分体现了微流控芯片集成化特点, 可以进一步应用于药物筛选和药物安全检测. Qin研究组^[24]设计出高通量的阻隔型细胞伤口愈合芯片模型, 芯片中每个细胞培养单元含3个微柱和3个挡板, 分别用于制作伤口、保证均匀沉积细胞(图2(c)). 该芯片形成的伤口边缘无大小及形状差异, 边缘细胞无损伤, 能用于研究不同浓度外源性因子对细胞迁移的影响, 重复性好、可行性高. 阻隔法形成的伤口形状可控, 但操作较为复杂, 阻隔物难以简洁、快速移除.

(iii) 电阻抗表征. Keese等人^[34]首先设计了可研究细胞迁移的电子细胞基质阻抗判断(electric cell-substrate impedance sensing, ECIS), 细胞在传感电极表面培养成单层后, 利用电刺激信号形成伤口, 随着细胞迁移, 由于细胞接近绝缘体, 使得阻抗会随着电极上细胞覆盖面积的增加而增大, 因此可通过阻抗变化实时定量监测细胞伤口愈合情况^[35,36]. 微流控芯片技术与ECIS的结合进一步优化了细胞迁移研究^[37,38], Wang等人^[23]在芯片中设置阵列结构电极, 自动监测细胞迁移过程. 芯片中每个细胞培养室内集成2个电极圈, 每个电极圈含49个金电极(图2(d)), 金电极表面借自组装分子膜改性从而抑制细胞在电极生长, 形成单层细胞后, 使电极上自组装分子膜脱落形成细胞伤口, 细胞开始在电极上迁移, 通过电极上阻抗变化, 实时定量监测细胞迁移速率. 该芯片创新性地结合了ECIS传感装置和伤口形成自组装技术, 不易出现细胞碎屑, 可实现高通量、自动化监测, 显

示了其在生物因子检测、药物筛选等方面的应用价值。Liu等人^[39]则在Y型微通道中嵌入16个阻抗探测电极,通过细胞生长迁移引起阻抗的变化,自动化检测细胞在细胞因子及药物作用下的迁移活动。这类将微流控芯片与ECIS结合研究细胞生长、转移、伤口愈合等现象的方法,相对于普通显微镜和荧光标记等传统方法更为直观和省时,并容易获得实时定量的测试结果。传统ECIS系统中,大面积参考电极和1个或多个小的检测电极固定在细胞培养皿底部,使很多细胞变化检测不到,也不利于规模化;而微流控芯片的微型化特点很好地避免了这些缺点,提高了检测面积与培养面积比,可实现规模化;但是复杂的设计与制作流程一定程度上限制了这类微流控芯片的发展与应用。

1.2 无伤口细胞迁移

由于形成伤口过程中对细胞会造成不同程度的损伤,会导致细胞形态改变及增殖与迁移的激活等特殊细胞反应,因此发展了无伤口类细胞迁移的微流控芯片。这类研究模型能避免伤口形成过程中产生的杂物、细胞碎片和细胞损伤等干扰,常用于细胞药物趋化性和趋电性研究^[40]。

(i) 趋化性。细胞趋化性指细胞依据环境中某些化学物质浓度变化而趋向运动的迁移,基于微流

控片技术建立稳定的物质浓度梯度,为细胞迁移研究提供了更多平台。Jeon等人^[41]率先设计出能够控制物质梯度的金字塔形网络微流控芯片,主要借助金字塔形网络结构的微通道使注入的化学药物不断分流、汇聚、混合,形成不同浓度后再经分支通道平行汇入金字塔末端主通道,最终在主通道内建立物质浓度梯度。该类芯片能够快速建立物质浓度梯度,并且可以根据流速及微通道直径、网络结构的设计精确控制梯度类型,如线性、多峰型、对称或非对称型等。随后,一系列相似的芯片模型被用于研究细胞在不同影响因子作用下的趋化行为^[42-46],Chen等人^[47]在2个蛇形微通道中间设计了仅能使单个细胞通过的瓶颈结构,模拟人体淋巴管结构。在2个蛇形通道分别注入细胞与化学诱导物后检测单个细胞的趋药运动,实现了单个细胞的迁移研究,且同时检测20个样本,充分体现了高通量优势。Cho等人^[48]精巧地设计了细胞趋化研究芯片,包含48个独立单元,每个单元内利用微阀连接3个平行小室,两侧小室则用于转载不同化学诱导物,中间的细胞培养小室两侧设置阵列横向迁移通道,通过控制微阀,可同时监测细胞在两侧不同诱导物作用下的趋化运动(图3(a))。该芯片建立了稳定的物质浓度梯度,成功监测了细胞在竞争性药物梯度下的迁移情况,快速获得大量数据。Mehling等人^[49]设计的自动化细胞培养平台包含6个细胞培养

图3 (网络版彩色)无伤口类细胞迁移的微流控芯片。(a) 竞争性物质梯度阵列芯片^[48]; (b) 单细胞迁移阵列芯片^[49]; (c) 电场可控型芯片^[50]; (d) 电化学组合型芯片^[51]

Figure 3 (Color online) Schematics of non-wound microfluidic chips for cell migration. (a) On-demand, competing gradient arrays^[48]; (b) arrays for real-time tracking single cell migration^[49]; (c) controllable electric fields in microfluidic device^[50]; (d) microfluidic device for studying cell migration in single or co-existing chemical gradients and electric fields^[51]

小室, 每个小室含10个细胞检测位点, 6个小室可以独立控制药物类型、平均浓度, 且可在不干扰细胞条件下可控变换浓度梯度类型, 最终精确定位、实时监控, 10个位点同时高通量检索单个细胞迁移, 为进一步分析细胞迁移提供了新思路(图3(b)). 除此之外, 更多结构新颖的浓度可控型微流控芯片层出不穷, 如通道桥连微流控芯片^[52]、复合气体梯度微流控芯片^[53]、多因素梯度微流控芯片^[54,55]和多浓度梯度微流控芯片^[56]等.

(ii) 趋电性. 除了药物趋化性, 细胞在直流电场中因受电场诱导会做出方向性迁移, 即细胞趋电性. Li等人^[50]将铂电极连接直流电源与单通道芯片形成闭合的电场微通道(图3(c)), 通过电脑控制多物理量变化调控电场, 研究T细胞对直流电场的反应, 实现了电场可控化、细胞迁移可视化、检测自动化, 推动了基于微流控技术电刺激条件下细胞迁移的研究. Tsai等人^[57]将聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)与培养皿组合并固定于ITO恒温细胞培养装置中, 主通道截成4个横截面完全相同的片段, 借助直流电最终集成多电场强度而流体速度均匀的微流控芯片. 该芯片具有零蒸发、零焦耳热、温度稳定等特点, 成功排除了流体速度的干扰, 有助于进一步研究生理电场对细胞迁移的影响. 上述微流控芯片可以自动化检测细胞趋电运动, 但由于需要外接电源以及电流控制系统, 使整体结构比较复杂. Zhao等人^[58]首次设计了可独立高通量检测细胞趋电运动的微流控平台, 上层与中间层包含电源等电路装置, 底层采用梯形电阻器结构形成线性电场强度, 可利用细胞在不同电场强度下迁移的差异性进行细胞筛选, 该芯片成功打破了外接电源的局限性, 充分体现了微流控芯片技术的集成优势. Lin研究组^[51]则使物质浓度梯度与直流电场在1张芯片上同时可控(图3(d)). 芯片从Y型分支入口分别注入培养基和趋化因子CCL19, 建立CCL19浓度梯度; 在主通道两侧分别设置20个横向微通道连接由琼脂糖包埋的铂电极, 形成直流电场; 实验检测到T细胞在CCL19浓度梯度影响下, 趋向阴极的迁移能力显著增强. 该芯片打破了在物质浓度梯度或电场刺激单一条件下研究细胞迁移的局限性, 体现了微流控芯片的集成化优势, 有助于进一步研究细胞在复杂微环境中的迁移情况, 但是通过微流体层流现象建立的浓度梯度难以精确控制及量化.

2 基于微流控芯片的3D细胞迁移

2D培养、生长方式与体内3D环境差别很大, 导致细胞与基质间以及细胞与细胞间的相互作用与真实生理条件下细胞的行为存在明显差异. 2D研究层次限制了人们对细胞迁移机制的理解, 构建3D微流控芯片模拟细胞生存微环境成为一种必然需求^[18,59]. 目前在微通道中构建3D体系的材料主要有琼脂糖、胶原蛋白等凝胶^[60-62], 凝胶具有良好的生物相容性, 且相比于聚二甲基硅氧烷(PDMS)装置, 不需等离子体清洗, 延展性好, 更易加工成型^[63,64]. Echeverria等人^[65]设计了含192个微管道的阵列结构, 在微管内填充胶原蛋白模拟3D细胞外基质, 对比不同肿瘤细胞迁移特性. 该系统不仅证实了胶原蛋白作为3D介质的有效性, 实现了细胞迁移的高通量研究, 且结合液体工作站(cyBi-well)控制液体流速, 形成全自动液体控制体系. 由于凝胶中溶质扩散率与水中扩散率相当, 因此细胞生长需要的营养物质或化学药物容易在其中扩散, 可短时间内形成稳定的物质浓度梯度. Kothapalli等人^[66]将胶原蛋白注入十字通道形成3D支架, 连接3个V型微通道, 微通道中分别装载细胞、细胞培养液和化学诱导物, 成功实现了神经细胞在3D胶原中药物浓度梯度下的趋化研究(图4(a)). 随后, Kothapalli研究组^[70,71]又简化了该芯片结构, 将中间十字通道改为T型通道, 在T型通道中接种细胞和3D胶原, 两端连接的2个V型微通道分别用于装载细胞培养液和化学诱导物, 进一步验证了胶原蛋白的3D支架可构建稳定的物质浓度梯度. 利用凝胶的这一特性, Sackmann等人^[69,72]设计了一种KOALA(kit-on-a-lid-assay)掌上诊断芯片(图4(d)), 上层多功能盖子将凝胶和化学诱导物混合, 通过凝胶使药物形成稳定浓度梯度, 底层通道可以植入细胞悬液或含细胞的3D基质用于细胞净化和趋化, 仅需借助微量样品便可在几分钟内净化和趋化嗜中性粒细胞. 该细胞趋化微流控平台用于鉴别哮喘和非哮喘患者的灵敏性和特异性分别为96%和73%, 检测快速、方便、重复性好, 操作温和, 甚至可用于婴儿中性粒细胞趋药性研究, 实现了微流控芯片的临床应用.

基于3D微流控芯片模拟肿瘤细胞微环境, 为研究细胞因子或基质细胞对肿瘤细胞的影响以及肿瘤侵袭转移机制提供了有力支持^[73]. Qin研究组^[67]选取基底膜提取物(BME)模拟细胞外基质设计了3D细胞共培养芯片(图4(b)). 通过微通道连接6个共培养单

图4 (网络版彩色)细胞迁移3D微流控芯片. (a) 3D浓度梯度可控型芯片^[66]; (b) 3D细胞共培养芯片^[67]; (c) 肿瘤-血管3D芯片^[68]; (d) KOALA掌上诊断芯片^[69]

Figure 4 (Color online) Schematics of microfluidic chips for 3D cell migration. (a) Gradient generate in a 3D chip^[66]; (b) microfluidic 3D co-culture device^[67]; (c) microfluidic tumor-vascular interface model^[68]; (d) KOALA microfluidic^[69]

元, 每个单元内设有2个连通的小室, 先将不同种细胞与BME混合物分别植入共培养单元的2个小室内, 再向中间主通道中加入培养液, 观察到癌相关成纤维细胞能够在3D基质中增强癌细胞以球体形式入侵的能力. 该芯片成功构建了肿瘤微环境, 实现了癌细胞与基质细胞的3D共培养, 再现了癌细胞在基质细胞调控下的侵袭模式, 为研究肿瘤微环境与癌细胞侵袭能力间的作用机制提供了一种新的3D视角. Kamm研究组^[68]则模拟肿瘤与组织界面环境, 设计了肿瘤-血管3D芯片模型(图4(c)), 利用水凝胶模拟3D细胞外基质连接2个平行微通道, 通道中分别植入肿瘤细胞与内皮细胞, 细胞分泌的细胞因子可在水凝胶中形成浓度梯度, 进而分析肿瘤细胞渗入血管与内皮细胞渗透性之间的联系, 该芯片为肿瘤转移与内皮屏障机制的研究提供了崭新的技术平台.

随着微流控芯片技术的不断成熟以及人们对细胞生理微环境认识的不断深入, 更多3D微流控芯片将被开发, 甚至创建器官特异性3D细胞迁移模型^[74], 为器官、组织靶向性药物和肿瘤机制等研究提供更好的方式.

3 结论

微流控芯片特有的网格通道结构、微米级尺寸、以及可同时在时间和空间上精确控制微流体等特点有利于更好模拟细胞体内真实生理环境, 各种用于细胞迁移研究的微流控芯片整理如表S1所示.

在单层伤口愈合类细胞迁移研究中, 胰蛋白酶消化法芯片结构简单, 操作相对容易, 伤口边缘细胞损伤小, 残留细胞碎片少, 提高了细胞伤口的可控性和重复性, 便于动态观察研究, 在近期取得了较大发展^[21,25-28], 有望成为细胞伤口愈合研究的标准化主流模型之一; 电刺激形成的伤口模型, 具有可塑性高、自动化等优势, 尤其是与ECIS技术结合的可标记性检测, 外部条件干扰少, 但在制作成本方面存在困难^[23]; 阻隔法对伤口细胞刺激小, 但一般结构复杂、操作不易, 制作和应用技术还不够成熟^[22,33]. 随着制作成本和技术的发展和成熟, 结合脉冲电压及阻隔法形成细胞伤口愈合模型的微流控芯片有可能给受伤后细胞迁移研究提供更多选择.

在2D无伤口类细胞趋化和趋电运动研究中, 微流控芯片可精确控制2D的腔室内物质的线性、抛物线性和周期性浓度梯度^[42,75]; 通过组合微通道实现多因素浓度梯度控制^[51,54], 可灵活设计的芯片结构增加了细胞迁移研究方法的多样性, 为细胞迁移研究带来前所未有的发展. 然而2D微流控芯片存在一定局限性, 缺乏由细胞基质构成的立体支架, 使细胞间联系减弱、细胞与基质间相互作用丧失等. 采用琼脂糖或明胶等凝胶代替细胞外基质, 构建基于微流控芯片的3D细胞培养和细胞迁移模型更真实地模拟了细胞生长微环境, 已经成为新的研究热点. 这类3D微流控芯片在细胞迁移研究方面将具有更为广阔的发展空间, 有利于更准确地开展细胞生物学研究,

进而丰富生命科学领域的信息量,但是3D介质材料的选择、结构的设计以及集成化检测都存在一定困难.

基于微流控芯片的细胞迁移模型推动了细胞迁移的研究进展,随着微流控芯片技术的不断成熟,更多形式的微流控芯片将会应用到细胞迁移研究中.一方面,芯片会趋向于集成化,结合材料、化学、电

子工程等不同学科优势,将反应与检测集成到1张芯片,实现多参数可控、高通量、自动化分析、以及对细胞迁移行为的精确控制;另一方面,采用3D基质,设计合理结构的微流控芯片,调整基质胶的硬度或选择不同生物材料、可溶性因子的梯度,更真实地模拟细胞体内环境,或构建组织、器官特异性的仿生芯片进一步推动细胞迁移研究.

参考文献

- 1 Ridley A J, Schwartz M A, Burridge K, et al. Cell migration: Integrating signals from front to back. *Science*, 2003, 302: 1704–1709
- 2 Liang C C, Park A Y, Guan J L. *In vitro* scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nat Protoc*, 2007, 2: 329–333
- 3 Zicha D, Dunn G A, Brown A F. A new direct-viewing chemotaxis chamber. *J Cell Sci*, 1991, 99: 769–775
- 4 Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorph nuclear leucocytes. *J Exp Med*, 1962, 115: 453–466
- 5 Albin A, Iwamoto Y, Kleinman H K, et al. A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res*, 1987, 47: 3239–3245
- 6 Melin J, Quake S R. Microfluidic large-scale integration: The evolution of design rules for biological automation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2007, 36: 213–231
- 7 Squires T M, Quake S R. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Rev Mod Phys*, 2005, 77: 977–1026
- 8 Whitesides G M. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 2006, 442: 368–373
- 9 West J, Becker M, Tombrink S, et al. Micro total analysis systems: Latest achievements. *Anal Chem*, 2008, 80: 4403–4419
- 10 Langelier S M, Chang D S, Zeitoun R I, et al. Acoustically driven programmable liquid motion using resonance cavities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 12617–12622
- 11 Mehling M, Tay S. Microfluidic cell culture. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 25: 95–102
- 12 Abbott A. Cell culture: Biology's new dimension. *Nature*, 2003, 424: 870–872
- 13 Yeon J H, Park J K. Microfluidic cell culture systems for cellular analysis. *Biochip J*, 2007, 1: 17–27
- 14 Meyvantsson I, Beebe D J. Cell culture models in microfluidic systems. *Annu Rev Anal Chem*, 2008, 1: 423–449
- 15 Huang M, Fan S, Xing W, et al. Microfluidic cell culture system studies and computational fluid dynamics. *Math Comput Model*, 2010, 52: 2036–2042
- 16 Zervantonakis I K, Kothapalli C R, Chung S, et al. Microfluidic devices for studying heterotypic cell-cell interactions and tissue specimen cultures under controlled microenvironments. *Biomicrofluidics*, 2011, 5: 13406
- 17 El-Ali J, Sorger P K, Jensen K F. Cells on chips. *Nature*, 2006, 442: 403–411
- 18 Shin Y, Han S, Jeon J S, et al. Microfluidic assay for simultaneous culture of multiple cell types on surfaces or within hydrogels. *Nat Protoc*, 2012, 7: 1247–1259
- 19 Riahi R, Yang Y, Zhang D D, et al. Advances in wound-healing assays for probing collective cell migration. *J Lab Autom*, 2012, 17: 59–65
- 20 Li J, Lin F. Microfluidic devices for studying chemotaxis and electrotaxis. *Trends Cell Biol*, 2011, 21: 489–497
- 21 Nie F, Yamada M, Kobayashi J, et al. On-chip cell migration assay using microfluidic channels. *Biomaterials*, 2007, 28: 4017–4022
- 22 Zheng C, Yu Z, Zhou Y, et al. Live cell imaging analysis of the epigenetic regulation of the human endothelial cell migration at single-cell resolution. *Lab Chip*, 2012, 12: 3063–3072
- 23 Wang L, Zhu J, Deng C, et al. An automatic and quantitative on-chip cell migration assay using self-assembled monolayers combined with real-time cellular impedance sensing. *Lab Chip*, 2008, 8: 872–878
- 24 Zhang M, Li H, Ma H, et al. A simple microfluidic strategy for cell migration assay in an *in vitro* wound-healing model. *Wound Repair Regen*, 2013, 21: 897–903
- 25 Xi Y L, Wang S T, Su B, et al. Wound healing assay using microfluidic channels. *Chem Res Chin Univ*, 2012, 28: 472–476
- 26 van der Meer A D, Vermeul K, Poot A A, et al. A microfluidic wound-healing assay for quantifying endothelial cell migration. *Am J Phys Heart Circ Phys*, 2010, 298: 719–725
- 27 Conant C G, Nevill J T, Schwartz M, et al. Wound healing assays in well plate-coupled microfluidic devices with controlled parallel flow. *J Assoc Lab Auto*, 2010, 15: 52–57

- 28 Murrell M, Kamm R, Matsudaira P. Tension, free space, and cell damage in a microfluidic wound healing assay. *PLoS One*, 2011, 6: e24283
- 29 Huang X, Li L, Tu Q, et al. On-chip cell migration assay for quantifying the effect of ethanol on MCF-7 human breast cancer cells. *Microfluid Nanofluid*, 2011, 10: 1333–1341
- 30 Pratt B M, Harris A S, Morrow J S, et al. Mechanisms of cytoskeletal regulation. Modulation of aortic endothelial cell spectrin by the extracellular matrix. *Am J Pathol*, 1984, 117: 349–354
- 31 Kroening S, Streiff C, Goppelt-Strube M. Analysis of matrix-dependent cell migration by a barrier migration assay. *Cell Commun Signal*, 2009, 7: A100
- 32 van Horssen R, ten Hagen T L. Crossing barriers: The new dimension of 2D cell migration assays. *J Cell Phys*, 2011, 226: 288–290
- 33 Sun Y S, Peng S W, Cheng J Y. *In vitro* electrical-stimulated wound-healing chip for studying electric field-assisted wound-healing process. *Biomicrofluidics*, 2012, 6: 34117
- 34 Keese C R, Wegener J, Walker S R, et al. Electrical wound-healing assay for cells *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 1554–1559
- 35 Earley S, Plopper G E. Disruption of focal adhesion kinase slows transendothelial migration of AU-565 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 350: 405–412
- 36 Heileman K, Daoud J, Tabrizian M. Dielectric spectroscopy as a viable biosensing tool for cell and tissue characterization and analysis. *Biosens Bioelectron*, 2013, 49: 348–359
- 37 Sun T, Swindle E J, Collins J E, et al. On-chip epithelial barrier function assays using electrical impedance spectroscopy. *Lab Chip*, 2010, 10: 1611–1617
- 38 Babchenko O, Kromka A, Conde J P, et al. Optically transparent diamond-pdms microfluidic system for electronic monitoring of cells. *Phys Status Solid B Basic Solid State Phys*, 2014, 251: 2593–2598
- 39 Liu L, Xiao X, Lei K F, et al. Quantitative impedimetric monitoring of cell migration under the stimulation of cytokine or anti-cancer drug in a microfluidic chip. *Biomicrofluidics*, 2015, 9: 034109
- 40 Wu J, Wu X, Lin F. Recent developments in microfluidics-based chemotaxis studies. *Lab Chip*, 2013, 13: 2484–2499
- 41 Jeon N L, Dertinger S K W, Chiu D T, et al. Generation of solution and surface gradients using microfluidic systems. *Langmuir*, 2000, 16: 8311–8316
- 42 Li J N, Baskaran H, Dertinger S K, et al. Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 826–830
- 43 Wang S J, Saadi W, Lin F, et al. Differential effects of EGF gradient profiles on MDA-MB-231 breast cancer cell chemotaxis. *Exp Cell Res*, 2004, 300: 180–189
- 44 Dertinger S K W, Chiu D T, Jeon N L, et al. Generation of gradients having complex shapes using microfluidic networks. *Anal Chem*, 2001, 73: 1240–1246
- 45 Rhoads D S, Guan J L. Analysis of directional cell migration on defined FN gradients: Role of intracellular signaling molecules. *Exp Cell Res*, 2007, 313: 3859–3867
- 46 Kim D, Haynes C L. On-chip evaluation of neutrophil activation and neutrophil-endothelial cell interaction during neutrophil chemotaxis. *Anal Chem*, 2013, 85: 10787–10796
- 47 Chen Y C, Allen S G, Ingram P N, et al. Single-cell migration chip for chemotaxis-based microfluidic selection of heterogeneous cell populations. *Sci Rep*, 2015, 5: 9980
- 48 Cho H, Hamza B, Wong E A, et al. On-demand, competing gradient arrays for neutrophil chemotaxis. *Lab Chip*, 2014, 14: 972–978
- 49 Mehling M, Frank T, Albayrak C, et al. Real-time tracking, retrieval and gene expression analysis of migrating human t cells. *Lab Chip*, 2015, 15: 1276–1283
- 50 Li J, Nandagopal S, Wu D, et al. Activated T lymphocytes migrate toward the cathode of DC electric fields in microfluidic devices. *Lab Chip*, 2011, 11: 1298–1304
- 51 Li J, Zhu L, Zhang M, et al. Microfluidic device for studying cell migration in single or co-existing chemical gradients and electric fields. *Biomicrofluidics*, 2012, 6: 24121–24123
- 52 Businaro L, De Ninno A, Schiavoni G, et al. Cross talk between cancer and immune cells: Exploring complex dynamics in a microfluidic environment. *Lab Chip*, 2013, 13: 229–239
- 53 Li N, Luo C, Zhu X, et al. Microfluidic generation and dynamically switching of oxygen gradients applied to the observation of cell aerotactic behaviour. *Microelectron Eng*, 2011, 88: 1698–1701
- 54 Park E S, Difeo M A, Rand J M, et al. Sequentially pulsed fluid delivery to establish soluble gradients within a scalable microfluidic chamber array. *Biomicrofluidics*, 2013, 7: 11804

- 55 Banks T A, Luckman P S, Frith J E, et al. Effects of electric fields on human mesenchymal stem cell behaviour and morphology using a novel multichannel device. *Integr Biol*, 2015, 7: 693–712
- 56 Zou H, Yue W, Yu W K, et al. Microfluidic platform for studying chemotaxis of adhesive cells revealed a gradient-dependent migration and acceleration of cancer stem cells. *Anal Chem*, 2015, 87: 7098–7108
- 57 Tsai H F, Peng S W, Wu C Y, et al. Electrotaxis of oral squamous cell carcinoma cells in a multiple-electric-field chip with uniform flow field. *Biomicrofluidics*, 2012, 6: 34116
- 58 Zhao S, Zhu K, Zhang Y, et al. Electrotaxis-on-a-chip (ETC): An integrated quantitative high-throughput screening platform for electrical field-directed cell migration. *Lab Chip*, 2014, 14: 4398–4405
- 59 Charras G, Sahai E. Physical influences of the extracellular environment on cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 813–824
- 60 Paguirigan A, Beebe D J. Gelatin based microfluidic devices for cell culture. *Lab Chip*, 2006, 6: 407–413
- 61 Kothapalli C R, van Veen E, de Valence S, et al. A high-throughput microfluidic assay to study neurite response to growth factor gradients. *Lab Chip*, 2011, 11: 497–507
- 62 Cheng S Y, Heilman S, Wasserman M, et al. A hydrogel-based microfluidic device for the studies of directed cell migration. *Lab Chip*, 2007, 7: 763–769
- 63 Haessler U, Kalinin Y, Swartz M A, et al. An agarose-based microfluidic platform with a gradient buffer for 3D chemotaxis studies. *Biomed Microdevices*, 2009, 11: 827–835
- 64 Chung S, Sudo R, Mack P J, et al. Cell migration into scaffolds under co-culture conditions in a microfluidic platform. *Lab Chip*, 2009, 9: 269–275
- 65 Echeverria V, Meyvantsson I, Skoien A, et al. An automated high-content assay for tumor cell migration through 3-dimensional matrices. *J Biomol Screen*, 2010, 15: 1144–1151
- 66 Kothapalli C R, van Veen E, de Valence S, et al. A high-throughput microfluidic assay to study neurite response to growth factor gradients. *Lab Chip*, 2011, 11: 497–507
- 67 Liu T, Lin B, Qin J. Carcinoma-associated fibroblasts promoted tumor spheroid invasion on a microfluidic 3D co-culture device. *Lab Chip*, 2010, 10: 1671–1677
- 68 Zervantonakis I K, Hughes-Alford S K, Charest J L, et al. Three-dimensional microfluidic model for tumor cell intravasation and endothelial barrier function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 13515–13520
- 69 Sackmann E K, Berthier E, Schwantes E A, et al. Characterizing asthma from a drop of blood using neutrophil chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 5813–5818
- 70 Srinivasan P, Zervantonakis I K, Kothapalli C R. Synergistic effects of 3D ECM and chemogradients on neurite outgrowth and guidance: A simple modeling and microfluidic framework. *PLoS One*, 2014, 9: e99640
- 71 Kothapalli C R, Honarmandi P. Theoretical and experimental quantification of the role of diffusive chemogradients on neuritogenesis within three-dimensional collagen scaffolds. *Acta Biomater*, 2014, 10: 3664–3674
- 72 Sackmann E K, Berthier E, Young E W, et al. Microfluidic kit-on-a-lid: A versatile platform for neutrophil chemotaxis assays. *Blood*, 2012, 120: 45–53
- 73 Sung K E, Yang N, Pehlke C, et al. Transition to invasion in breast cancer: A microfluidic *in vitro* model enables examination of spatial and temporal effects. *Integr Biol*, 2011, 3: 439
- 74 Jeon J S, Bersini S, Gilardi M, et al. Human 3D vascularized organotypic microfluidic assays to study breast cancer cell extravasation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 818
- 75 Giaever I, Keese C R. Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 7896–7900

补充材料

表 S1 基于微流控芯片的细胞迁移研究文献总结

本文以上补充材料见网络版 csb.scichina.com。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。

Cell migration with microfluidic chips

LIU WenTing^{1,2}, CHEN HongMei¹ & NIE FuQiang¹

¹ Suzhou Institute of Nano-Tech and Nano-Bionics, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215123, China;

² University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Cell migration plays a pivotal role in various physiological and pathological processes including angiogenesis, cancer metastasis, wound healing, inflammation, and embryogenesis. For cell migration *in vitro*, the conventional cell migration assays like the Boyden chamber and wound-healing assays are unable to meet the requirements of high-throughput, and are incapable of integrating complex environmental factors to comprehensively consider multi-parameters factors, such as cell matrix and concentration gradient, particularly those effecting cell migration. In contrast, microfluidic chips have the potential to take these challenges by allowing for precise and simultaneous control of multiple environmental factors mimicking *in vivo* environment of cells. Microfluidic devices successfully produce accurately controllable fluid and stable concentration gradient quickly, and manipulate gradients spatially and temporally. In addition, microfluidic devices enables accurate and reliable cell migration assay on real-time observation with limited amounts of reagents. It has exhibited tremendous potential due to its miniaturization, integration, high-throughput and high-precision. Owing to these particular advantages, over the past few years, a number of microfluidic chips combining two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) cell cultures have already been widely used in cell migration assays, demonstrating that microfluidic technology has significant implications for cell biology and cell-based assays. The microfluidic chips for cell migration assay using 2D platform could be classified into wound-healing and non-wound assays. Wound edges could be attained though a laminar flow of trypsin solution or removing solid barrier. After wound formed, cell migration could be detected and monitored using electric cell-substrate impedance sensing. Non-wound assays include chemotaxis and electrotaxis. The *in vivo* microenvironment is characterized by a 3D scaffold and multiple cell types. Therefore, increasing microfluidic devices with a 3D cell culture system have been developed for cell chemotaxis. These chips embed cells in a structure manufactured using agarose, collagen and hydrogel that mimics the extracellular matrix (ECM) of structural proteins found in real and living tissues. Various microfluidic devices with a 3D cell culture model can present cell-matrix and cell-cell interactions and provide reliable analysis platform for cell migration. Briefly, 2D and 3D microfluidic chip-based models for concentration gradients, chemotaxis, electrotaxis and cells interactions have beneficial effects on cell migration assays. As a breakthrough to conventional methods, those microfluidic chip-based cell migration assays really promote the advanced progress in the area of cell biology and biomedicine. In this review, we describe the characterization of cell migration assays in microfluidic systems, highlight latest advances of the microfluidic device for researching in cell migration, focusing on both 2D and 3D cell cultures, and discuss advantages and disadvantages of this rapidly developed analysis technology.

microfluidic chip, cell migration, wound healing, concentration gradient, electrotaxis, two-dimension, three-dimension

doi: 10.1360/N972015-01055