

文章编号: 1005-5630(2024)02-0014-06

DOI: 10.3969/j.issn.1005-5630.202303110052

三维培养结肠癌细胞的微流控芯片 荧光成像研究

蔡书祺, 郑璐璐, 张大伟

(上海理工大学 光电信息与计算机工程学院, 上海 200093)

摘要: 改良了一种微流控芯片, 可用于对结肠癌细胞进行三维培养并实现实时荧光成像。在结肠癌细胞内植入内源性的红色荧光蛋白, 使用激光共聚焦显微镜对芯片中三维培养的细胞进行成像。通过细胞内部红色荧光蛋白的表达, 可以观测到细胞的生长状态, 实现对细胞的实时监测和高分辨率荧光成像。同时, 通过免疫荧光染色来表征反映细胞活性的特征蛋白, 其荧光强度和蛋白表达呈正相关。研究结果提示, 细胞活性相关蛋白的表达受到微环境的影响, 其在芯片三维培养中的活性强于二维培养, 表明芯片内环境更加接近真实的人体微环境。该方法为进一步探究肿瘤细胞转移机制及相关药物的筛选研究提供了一种新的技术手段及实验平台。

关键词: 微流控芯片; 三维培养; 荧光成像; 荧光蛋白

中图分类号: TB 39 **文献标志码:** A

Investigation of fluorescence imaging in microfluidic chip for three-dimensional cultivation of colon cancer cells

CAI Shuqi, ZHENG Lulu, ZHANG Dawei

(School of Optical-Electrical and Computer Engineering, University of Shanghai for Science and
Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: This article presents an improved method for the three-dimensional cultivation of colon cancer cells and the realization of real-time fluorescence imaging using a microfluidic chip. By incorporating endogenous red fluorescent protein into the colon cancer cells, we employed laser confocal microscopy to visualize the cells cultivated within the chip in three dimensions. The expression of intracellular red fluorescent protein allowed for the observation of cell growth status, facilitating real-time monitoring and high-resolution fluorescence imaging. Moreover, immunofluorescence staining was employed to characterize feature proteins indicative of cellular activity, with their fluorescence intensity demonstrating a positive correlation with protein expression. The research findings indicate that the expression of activity-related proteins is influenced by the microenvironment, exhibiting stronger activity in the three-dimensional

收稿日期: 2023-03-11

基金项目: 上海市军民融合发展专项资金科技创新支持项目 (2020-jmrh-kj8)

第一作者: 蔡书祺 (1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为微流控芯片。E-mail: 202310326@st.usst.edu.cn。

通信作者: 郑璐璐 (1982—), 女, 副教授, 研究方向为医用光学和微纳加工。E-mail: llzheng@usst.edu.cn

cultivation on the chip compared to the two-dimensional approach. This suggests that the microenvironment within the chip more closely resembles the actual microenvironment within the human body. This method provides a novel technical approach and experimental platform for further exploration of tumor metastasis mechanisms and the screening of related drugs.

Keywords: microfluidic chip; three-dimensional cultivation; fluorescence imaging; fluorescent protein

引 言

二维培养在生物医学研究中已经具有一个比较成熟的方案, 它为人们提供了一种简单、快速和经济的实验方法。然而, 哺乳动物细胞通常生长在一个复杂的三维微环境中, 细胞与细胞以及细胞与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)之间相互作用, 形成了一个通信网络。该网络用以维持相关细胞组织的生理特征^[1]。研究中常使用以水凝胶代表亲水交联聚合物的三维网络, 其与软组织力学性质相似, 用于模拟 ECM, 以支持细胞代谢物和所需养分的运输及细胞的粘附^[2]。微流体、光流体及类器官培养等新技术促进了疾病及药物的相关研究的新发展。在这些新技术中, 微流体芯片技术因具有降低实验成本, 缩短实验时间的潜力, 获得了巨大的发展。研究表明, 在癌症研究中, 利用芯片中的三维结构可以更真实地模拟人体内微环境, 有利于人们对细胞的增殖、转移等情况的观察^[3]。在微流控芯片中, 通道的微小尺寸可以引导和控制流体的运动^[4], 不仅减少了试剂的使用量, 而且通过控制微流体可模拟微生理环境, 从而增强了细胞内的代谢水平^[5]。目前, 微流控芯片的三维细胞培养技术仍存在一些局限性: 大部分的微流控芯片采用的微通道相对简单, 和人体血管结构相差较大, 难以模拟实际血管与周围细胞组织之间的物质交换, 难以还原人体内微环境, 需要更好地改良芯片内微环境, 以保持细胞的活性和状态。因此, 利用微流控芯片构建血管网络, 实现组织与血管网络交互, 更加真实地模拟人体微环境, 具有很大的研究价值。

本文设计了微流控芯片平台来实现人结肠癌细胞 HT-29 的三维培养^[6]。利用细胞内植入的红色荧光蛋白, 进一步研究了微流控芯片内三维培养细胞的荧光特性。通过外源性的绿色荧光蛋白表

征了三维培养和二维培养的细胞之间的活性差异。结果显示, 微流控芯片中细胞的荧光成像效果较好, 该研究在疾病研究领域拥有广泛的应用前景。

1 微流控芯片中三维细胞培养的特性

微流控芯片的微结构可以控制细胞的生长和分化。相比于传统的二维细胞培养, 微流控芯片中的三维细胞培养能够提高细胞存活率, 从而提高细胞实验的成功率^[7]。芯片中的三维细胞培养能够模拟组织和器官的部分结构和形态, 包括细胞密度、细胞排列方式等, 从而能够更真实地模拟体内生理状态, 同时促进细胞聚集和形成组织结构, 可以使其在芯片内的三维培养对比其他三维培养, 例如在培养皿中培养更加具有优势^[8-9]。通过激光共聚焦显微镜等显微成像的方式能很容易地获得微流控芯片内的细胞三维状态, 可以提供更真实的细胞形态的高分辨率图像^[10]。荧光生物成像作为一种细胞生物学中先进的成像技术^[11], 被用作疾病的诊断工具^[12], 常用在二维细胞培养、动物模型和人体组织的高分辨率成像^[13]。但二维样品存在一些实时成像的问题, 如成像过程中的细胞活力衰减。微流控芯片中的三维细胞培养可以提高荧光成像的稳定性和可重复性, 它可以通过调节流体的流速、压力和结构, 控制细胞的位置, 从而实现了对细胞的精确控制, 使得三维培养细胞的生长状态更加稳定^[14-15]。

2 实验部分

2.1 试剂和仪器

磷酸盐缓冲盐溶液(phosphate buffer solution,

PBS)、DMEM 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、Triton 溶液购于赛默飞公司, 牛纤维蛋白原和凝血酶购于索莱宝公司, UQCRC1 抗体、用激发波长 488 nm 的异硫氰酸荧光素结合的二级抗体 (FITC488)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 购于艾博抗公司。所用化学试剂均为分析纯。

使用的仪器主要有: SUSS MicroTec MJB4 紫外曝光机, SC-1B 匀胶机, PDC-FMG-2 离子机清洗机, CarlZeiss LSM 900 激光共聚焦显微镜。

2.2 微流控芯片的制备

通过 AutoCAD 软件进行微流控芯片的设计, 设计完成后, 进行软光刻的掩膜板制造。随后, 使用光刻机通过光掩膜对硅晶片进行曝光, 形成具有 110 μm 高度的集成硅晶片, 然后进行适当的显影 (如图 1)。制作好的硅晶片需要在密封箱中, 用三甲基氯硅烷蒸气熏 30 min, 以便于后续脱膜。将聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 预聚物溶液 (PDMS 与固化剂 10 : 1 的质量比充分混合), 在真空箱中脱气后, 浇筑到已经预处理好的硅晶片上, 并再次在真空箱中脱气, 80 $^{\circ}\text{C}$, 固化 1.5 h。剥离和切割整个叶脉网络的 PDMS 层, 使用异丙醇溶液浸泡 PDMS 层, 除去残余的三甲基氯硅烷, 然后用去离子水洗涤, 在灌注孔入口和出口处使用 0.6 mm 的针进行打孔, 再用氧等离子体将腔室层与玻璃基板接合 (如图 2(b))。

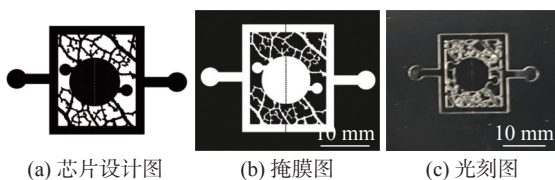


图 1 微流控芯片的制作示意图

Fig. 1 Fabrication of microfluidic chips

2.3 水凝胶的制备

水凝胶法是构建三维细胞体系最常用的方法之一。本实验采用人工提取的纤维蛋白和来自哺乳动物血液的凝血酶来构建水凝胶结构。纤维蛋

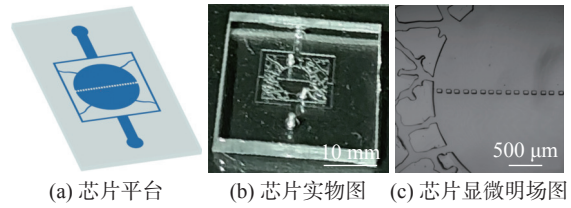


图 2 网状结构及腔室的微流控芯片平台

Fig. 2 Microfluidic chip platform with mesh structure and chambers

白由 3 对肽链组成, 在形成水凝胶的过程中, 凝血酶在 Ca^{2+} 作用下激活纤维蛋白稳定因子, 生成转谷氨酰胺酶, 使纤维蛋白原单体间的非共价键转变成共价键, 将纤维末端相连, 形成稳定的、交联的纤维蛋白凝胶。用生理盐水配制 1 000 U/mL 的凝血酶溶液。

2.4 细胞试验

人结肠癌细胞 HT-29 购于中科院细胞库。在此 HT-29 细胞系上, 制得红色荧光蛋白转染的 HT-29 细胞系。2 种细胞均在添加了 10% 胎牛血清、1% 青霉素和 1% 链霉素的 DMEM 培养基中培养。细胞的培养环境为: 温度 37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 体积分数 5%, 湿度 95%。为观察三维培养细胞的荧光成像情况, 将 HT-29 细胞悬浮在 6 U/mL 凝血酶与 3 mg/mL 纤维蛋白原 1 : 1 配置而成的混合溶液中, 快速将制备好的混合溶液注入到微流控芯片中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 1 h, 使纤维蛋白原交联, 形成水凝胶。随后灌注培养基, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养, 同时以常规二维平面培养方式在微流控芯片内培养 HT-29 细胞。

2.5 免疫荧光实验

用免疫荧光的方法表征了 HT-29 三维细胞培养的相关标记物 UQCRC1 蛋白。首先用 PBS 洗涤去除残余培养基, 用 0.1% 的 PBS Triton 溶液渗透 10 min, 用 5% 的牛血清白蛋白封闭 1 h, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内, 使用单克隆抗体 UQCRC1 孵育过夜。然后用 PBS 洗涤细胞, 再使用 FITC488 结合的二抗孵育 2 h。孵育后, 用 PBS 洗涤细胞并使用 DAPI 对细胞核进行染色, 之后用共焦显微镜成像。将相关蛋白质的强度比标准化, 并使用 ImageJ 软件分析荧光强度。

3 结果与讨论

3.1 微流控芯片的设计

微流控芯片的通道形状和尺寸会直接影响流体的流动以及芯片内细胞的状态, 所以在设计通道时需要考虑流体性质、操作流程、检测方式等因素, 以优化通道的几何形状和尺寸。受自然复合血管网络的启发, 由于动物和植物通过该网络可以有效地远距离运输流体并遵守默里定律^[9], 因此在芯片设计中, 左右 2 个腔室用来接种水凝胶三维培养 HT-29 细胞, 周围的血管状结构用来为细胞供给养分(如图 2(b))。

3.2 芯片中三维培养细胞的高分辨荧光成像

为了实现对微流控芯片中三维培养细胞的高分辨成像, 使用了 2 种不同的荧光蛋白来对 HT-29 细胞进行荧光表征。一种是采取基因组编辑方法, 使用慢病毒转染的方式, 生产表达红色荧光蛋白(red fluorescence protein, RFP)标签的转基因 HT-29 细胞系。RFP 可由波长为 532 nm 的激光激发, 并在 582 nm 处进行检测。通过 RFP 可以对 HT-29 细胞进行实时状态监测。另一种是通过二抗结合的 FITC488 来表征芯片中三维培养环境的细胞活性相关蛋白, 以验证芯片中细胞的生长状态。FITC488 可由波长为 488 nm 的激光激发, 并在 528 nm 处进行检测。采用激光共聚焦显微镜对三维培养的细胞进行透射成像。激光共聚焦显微镜使用的激光束经过聚焦后, 能够在焦点处获得高强度的激光, 可实现成像的高分辨率, 甚至可以达到亚细胞水平的分辨率。在获取三维细胞图像时, 使用的扫描方式有点扫描和线扫描 2 种。由于需要获取整个微流控芯片内部的三维细胞图像, 传统点扫描方式使用一个非常小的点对样品进行扫描, 成像面积小, 成像时间长。而线扫描方式则使用一条细的光线对样品进行扫描, 可以直接得到连续的二维图像, 成像面积大, 成像时间短。其还可以通过沿 z 轴方向扫描, 获取样品垂直方向 100 μm 的图像, 而每 1 μm 中包括 100 张平面中的荧光信息图片, 用于 3D 图像重建(如图 3)。

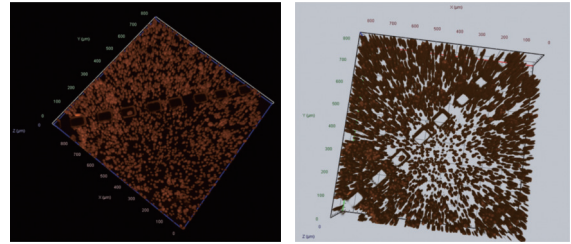


图 3 微流控芯片内三维荧光成像图

Fig. 3 Microfluidic in-chip 3D fluorescence imaging

3.3 微流控芯片中三维细胞的荧光特性

RFP 基因被转录进 HT-29 细胞后, 表达的 RFP 蛋白属于内源性荧光团, 是已经存在于样品中的荧光生物分子, 有助于细胞的自发荧光, 且具有优异的荧光性能和较低的生物毒性。三维培养下的 HT-29 细胞形成细胞团, 形态在明场图中清晰可见(如图 4(a))。当受到 532 nm 的激光激发后, HT-29 细胞在暗场图中显示出较强的红色荧光(如图 4(b))。在叠加图(如图 4(c))中可以看到, RFP 作为内源性荧光团的特点是不需要特异性标记, 由细胞自身分泌表达的荧光蛋白。细胞内蛋白分泌量和细胞的代谢及功能状态有关系, 其荧光强度和荧光蛋白表达的多少成正比^[16], 可以提供有关样品代谢和功能状态的信息, 可用于区分健康细胞和低活性细胞。

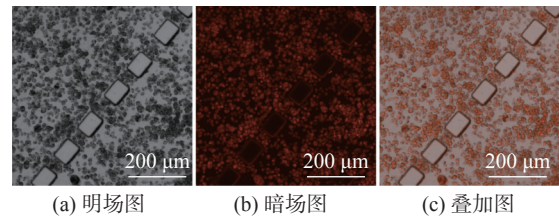


图 4 微流控芯片内三维培养的 HT-29 细胞 RFP 荧光图像

Fig. 4 RFP fluorescence images of HT-29 cells cultured in 3D within a microfluidic chip

3.4 三维细胞相关标志物的荧光分析

UQCRC1 是一种线粒体蛋白, 在线粒体内部的调控中起着关键作用^[17-18]。在三维细胞培养下, HT-29 细胞中 UQCRC1 蛋白表达增多(如图 5), 表明其线粒体功能比二维细胞培养的有所增加。而 FITC488 外源性荧光蛋白解决了内源性荧光团特异性低的局限性, 它可以通过特定的荧光标记物来标记并检测蛋白分子的表达和分

布, 这种技术可以用来研究蛋白质相互作用、信号转导、蛋白质定位等问题。同时外源性荧光团的寿命范围以及使用方式具有多样性, 不受到细胞状态的影响。

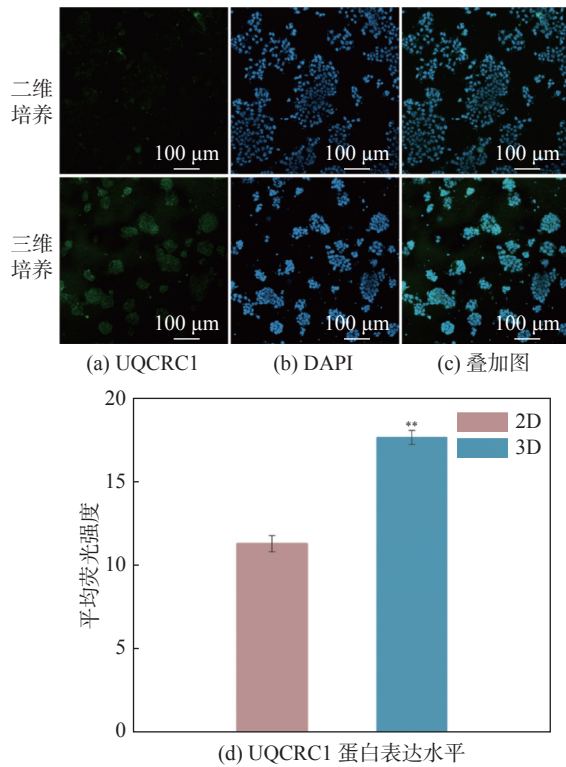


图 5 三维和二维培养下的 HT-29 细胞的蛋白表达水平
Fig. 5 Protein expression levels of HT-29 cells in 3D and 2D cultures

4 结 论

简单高效地构建了具有良好的透光性和细胞兼容性的类血管结构的微流控芯片, 其制造过程简单, 成本低且稳定性高。类血管结构保证了细胞在微流控芯片中的营养供应, 维持了细胞在芯片内的高活力。同时通过在 HT-29 细胞内植入内源性的 RFP 蛋白, 利用微流控芯片进行三维细胞培养, 使用共聚焦显微镜对微流控芯片内的细胞进行成像, 验证红色荧光蛋白已经在细胞内充分表达, 可以在不进行细胞死活染色的情况下区分细胞的死活状态, 实现细胞状态的监测。该方法可以用于基于微流控芯片的药物开发, 以评估潜在的药物化合物的毒性。通过基于细胞的荧光成像进一步验证了三维培养下的 HT-29 细胞

与二维培养下的细胞活性的差别。经过免疫荧光处理的三维细胞具有了外源性的绿色荧光蛋白, 在激发条件下, 三维培养的 HT-29 细胞绿色荧光强度明显强于二维培养细胞的, 验证了微流控芯片三维培养环境下 HT-29 细胞中 UQCRC1 蛋白的表达量提高, 显示出在微流控芯片三维培养环境下能更好地模拟体内的真实环境。常规二维培养中发生的细胞扁平化会导致细胞骨架、基因表达、核形状、细胞增殖和分化、药物治疗易感性等发生异常。微流控芯片平台体外细胞培养可以更好地模拟真实的体内组织, 较二维细胞模型更适合用于癌症的发生和转移机制及药物筛选的研究。

参考文献:

- [1] KLEINMAN H K, PHILP D, HOFFMAN M P. Role of the extracellular matrix in morphogenesis[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14(5): 526 – 532.
- [2] FENNEMA E, RIVRON N, ROUWKEMA J, et al. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues[J]. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(2): 108 – 115.
- [3] ZHANG B Y, RADISIC M. Organ-on-a-chip devices advance to market[J]. *Lab on a Chip*, 2017, 17(14): 2395 – 2420.
- [4] VAN MIDWOUT P M, VERPOORTE E, GROOTHUIS G M M. Microfluidic devices for *in vitro* studies on liver drug metabolism and toxicity[J]. *Integrative Biology*, 2011, 3(5): 509 – 521.
- [5] WU Q R, LIU J F, WANG X H, et al. Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects[J]. *BioMedical Engineering OnLine*, 2020, 19(1): 9.
- [6] YAN W Z, XIE D Q, ZENG J. Protonation states and conformational flexibility of the red fluorescent protein chromophore[J]. *Journal of Theoretical and Computational Chemistry*, 2009, 8(6): 1117 – 1129.
- [7] ZOU ZY, LIN Z, WU CL, et al. Micro-Engineered Organoid-on-a-Chip Based on Mesenchymal Stromal Cells to Predict Immunotherapy Responses of HCC Patients[J]. *ADVANCED SCIENCE*, 2023, 27(10): 2198 – 3844.
- [8] TAJEDDIN A, MUSTAFAOGLU N. Design and fabrication of organ-on-chips: promises and challenges[J]. *Micromachines*, 2021, 12(12): 1443.

- [9] SHIN Y, HAN S, JEON J S, et al. Microfluidic assay for simultaneous culture of multiple cell types on surfaces or within hydrogels[J]. *Nature Protocols*, 2012, 7(7): 1247 – 1259.
- [10] BEREZIN M Y, ACHILEFU S. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging[J]. *Chemical Reviews*, 2010, 110(5): 2641 – 2684.
- [11] BAJAR B T, WANG E S, LAM A J, et al. Improving brightness and photostability of green and red fluorescent proteins for live cell imaging and FRET reporting[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 20889.
- [12] YANG Y W, CHEN Y, Pei Y et al. Fluorescence-amplified nanocrystals in the second near-infrared window for in vivo real-time dynamic multiplexed imaging[J]. *Nature Nanotechnology* ., 2023, 18(10): 1195 – 1204.
- [13] HORTON N G, WANG K, KOBAT D, et al. *In vivo* three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain[J]. *Nature Photonics*, 2013, 7(3): 205 – 209.
- [14] VAN DUINEN V, TRIETSCH S J, JOORE J, et al. Microfluidic 3D cell culture: from tools to tissue models[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 35: 118 – 126.
- [15] KIM J A, HONG S, RHEE W J. Microfluidic three-dimensional cell culture of stem cells for high-throughput analysis[J]. *World Journal of Stem Cells*, 2019, 11(10): 803 – 816.
- [16] GAUNT M W, YEO M, FRAME I A, et al. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes[J]. *Nature*, 2003, 421(6926): 936 – 939.
- [17] AYE-HAN N N, ALLEN M D, NI Q, et al. Parallel tracking of cAMP and PKA signaling dynamics in living cells with FRET-based fluorescent biosensors[J]. *Molecular BioSystems*, 2012, 8(5): 1435 – 1440.
- [18] LIN C S, LIU L T, OU L H, et al. Role of mitochondrial function in the invasiveness of human colon cancer cells[J]. *Oncology Reports*, 2018, 39(1): 316 – 330.

(编辑: 李晓莉)