

文章编号 1004-924X(2025)08-1228-10

靶向药物浓度筛选微流控器件的设计与制作

霍兆林¹, 丁来钱², 亓东锋¹, 刘冲², 魏娟^{1*}

(1. 山东理工大学机械工程学院, 山东淄博 255000;

2. 大连理工大学辽宁省微纳米及系统重点实验室, 辽宁大连 116000)

摘要:为筛选靶向药物浓度, 设计制作了集成浓度梯度发生器的细胞共培养微流控器件。对器件内的浓度梯度生成原理、浓度场、速度场和细胞共培养特性进行了研究。首先, 根据等效电路原理设计了可以生成5:1:0浓度梯度的微通道模型, 采用串并联结构形式设计了药物浓度作用细胞共培养单元, 进行了浓度梯度单元与细胞共培养单元集成。然后, 利用有限元仿真软件Comsol中的层流和物质传递模块进行了速度场和浓度场仿真验证。最后, 采用软刻蚀技术制作了该微流控器件, 分别采用荧光素钠溶液和1 μm 直径聚苯乙烯悬浮液模拟药物浓度分布; 在器件内进行了Hela细胞与A549细胞的共培养, 并分析了两种细胞的生长曲线和叶酸受体靶向性。仿真与实验结果表明: 设计的微流控器件能够生成设定的浓度梯度(浓度比例5:1:0), 每一分支的细胞培养单元内浓度差异在0.1%以内; 细胞培养单元内流速分布均匀, 培养单元内的平均流速为 $(7.1 \pm 0.3) \mu\text{m/s}$; 两种细胞的生长符合S型生长规律, 细胞膜染色实验表明在该微流控器件内能够实现两种细胞的平行共培养。研究结果表明, 该微流控器件能够模拟细胞在体内的流动环境, 为靶向药物浓度筛选和个性化治疗提供了技术平台。

关键词:微流控; 细胞微环境; 靶向药物浓度筛选; 平行共培养

中图分类号: TP394.1; TH691.9 **文献标识码:** A

doi: 10.37188/OPE.20253308.1228

CSTR: 32169.14.OPE.20253308.1228

Design and fabrication of microfluidic device used for concentration screening of targeted-drugs

HUO Zhaolin¹, DING Laiqian², QI Dongfeng¹, LIU Chong², WEI Juan^{1*}

(1. School of Mechanical Engineering, Shandong University of Technology, Zibo 255000, China;

2. key Laboratory of Micro/nano Technology and System of Liaoning Province, Dalian University of Technology, Dalian 116000, China.)

* Corresponding author, E-mail: weijuan@sdut.edu.cn

Abstract: To screen the concentrations of targeted drugs, a cell co-culture microfluidic device with an integrated concentration gradient generator was designed and fabricated. The principles of concentration gradient generation, the concentration fields, the velocity fields, and the ability of cell co-culture within the device were studied. A microchannel model capable of generating a 5:1:0 concentration gradient was designed based on the equivalent circuit principle, using a series-parallel structure to integrate the concentra-

收稿日期: 2025-01-10; 修订日期: 2025-02-24.

基金项目: 国家重点研发计划项目(No. 2022YFB4600402); 山东省自然科学基金项目(No. ZR2021QE130); 山东省青年泰山学者项目(No. tsqn202306192)

tion gradient unit with the cell co-culture unit. The velocity and concentration fields were simulated and validated using the laminar flow and mass transfer modules in the finite element simulation software Comsol. The microfluidic device was fabricated using soft lithography techniques, and fluorescein sodium solution and polystyrene suspension with a 1 μm diameter were used to simulate drug concentration distribution. Co-culture of Hela cells and A549 cells was performed within the device, and the growth curves and folate receptor targeting of both cell types were analyzed. Simulation and experimental results indicate that the designed microfluidic device could generate the desired concentration gradient (5:1:0 ratio), with concentration variation within each branch cell culture unit below 0.1%. The velocity distribution in the cell culture unit is uniform, with an average flow velocity of $(7.1 \pm 0.3) \mu\text{m/s}$ under an inlet flow rate of 925 $\mu\text{m/s}$. The growth of both cell types follows an S-shaped growth curve, and membrane staining experiments demonstrate the successful parallel co-culture of two cell types within the microfluidic device. These findings demonstrate that microfluidic device could simulate the in vivo fluidic environment of cells and provide a technological platform for targeted drug concentration screening and personalized therapy.

Key words: microfluidics; cell microenvironment; targeted drugs concentration screening; parallel co-culture

1 引言

肿瘤靶向药物具有靶向性、药物用量少、全身毒副作用低等特点,是抗癌药物发展的一个重要方向^[1-3]。在新药研发和个性化治疗过程中,细胞水平的药物靶向性验证与浓度筛选具有巨大价值^[4-6],而微流控芯片的通道网络与体内脉管系统相似,使得利用微流控技术进行细胞药物作用分析展现出广阔的应用前景^[7-9]。近年来,微流控器件在构建细胞微环境方面得到了广泛应用,其构建的细胞微环境主要涵盖生物化学因素(如pH值、氧气浓度和可溶性因子浓度)以及生物物理因素(如细胞外基质的刚度、硬度、孔隙率以及由流动产生的剪切力和液压差等机械力)^[10]。例如, Tomita等利用微流控技术生成了pH8.3到pH6.8可调的微环境,探讨了pH对中性粒细胞样细胞迁移行为的影响^[11]; Ding等设计的三层结构芯片能够在低氧与常氧条件下形成不同氧气浓度,进而研究了氧气浓度对肿瘤细胞行为的影响^[12]; Soliman等开发的新型平台则通过在形状和大小可控的水凝胶中引入小分子扩散,制造出具有形状控制和硬度梯度的水凝胶,以更真实地模拟细胞外基质的微环境^[13]。此外, Liu课题组基于网状脉序仿生原理构建的微流体结构单元冗余设计模型,实现了流场均一旦稳定的体内流动环境,并成功对细胞在动态培养条件下的增

殖、铺展、存活及迁移进行了分析^[14-18];在细胞三维培养及其微环境构建方面, Han等利用数字光处理技术精确模式化生物墨水构建了血管模型、微血管网络模型、肿瘤簇模型及3D共培养肿瘤模型,应用于低氧、药物及细胞迁移侵袭测试^[19],而Liu等则提出了结合3D打印与微流控技术的三维动态培养器件^[20]。

在药物浓度生成和筛选领域,微流控技术同样展现出显著的应用潜力。通过设计溶液连续稀释的多级混合浓度梯度生成器(Concentration Gradient Generator, CGG),可以高效地控制并生成不同的药物浓度梯度,以满足多样化的药物测试需求。最早由 Whitesides课题组提出的连续稀释方法已被用于生成对称、不对称、平滑、阶梯以及多峰值等多种梯度,不同结构形式的混合单元也在梯度发生器设计中得到应用^[21],其中Li等提出的集成蛇形微混合器系统被用于培养人类肿瘤相邻支气管上皮细胞以研究恶性转变^[22],而Wang等则通过机器学习和自动化有限元分析随机生成大量设计,从数据库中筛选出适用于特定任务的芯片设计,从而避免了传统手动设计的繁琐^[23]。

目前,针对肿瘤靶向药物浓度筛选的微流控器件报道较少,而细胞共培养在药物筛选过程中起着重要作用,为多种细胞提供统一的培养环境,有助于降低外界因素对药物作用的干扰。共

培养体系既包括直接共培养,也包括间接接触共培养,常用于神经细胞相互作用及细胞迁移研究^[24]。例如,Jastrzebska等设计的多功能微流控芯片实现了对细胞系的精确沉积,并通过共用培养介质促进细胞间近距离交流,既满足了细胞共培养、单细胞培养与混合培养的需求,又可用于细胞迁移分析和光动力疗法^[25];而Liu等开发的高通量微流控芯片则将螺旋混合器的浓度梯度发生器与3D共培养系统相结合,通过在去细胞化细胞外基质水凝胶中共培养神经母细胞瘤和人脑微血管内皮细胞构建了肿瘤血管化微环境,实现了对lipid-DOX纳米颗粒浓度的精确控制,从而提高了药物筛选的通量,尽管凝胶富集的3D多孔结构可能使定量分析更为复杂^[26]。

基于上述背景,本文设计了一种全新的微流控器件,该器件能够在同一流体微环境下实现多株细胞的平行共培养,并生成跨扩散系数的药物浓度梯度,用于靶向药物的浓度筛选。该器件由浓度梯度生成器(CGG)和串并联耦合的细胞共培养单元构成,其中CGG采用基于等效电路模型的设计,并利用有限元法对细胞培养单元内的流场与浓度场进行研究。同时,通过使用荧光素钠溶液和聚苯乙烯微球悬浮液模拟靶向药物,验证了器件在不同扩散系数药物下的浓度生成能力,并最终实现了Hela与A549细胞的平行流动共培养。与现有的微流控器件相比,本研究的器件在混合单元的设计上通过优化等效电路模型及有限元仿真,实现了高效均匀的混合过程,从而保证了药物浓度梯度的稳定性和重复性;在细胞培养单元的设计上,通过精细优化通道结构,使得流场分布更加均一,从而为细胞提供了理想的生长环境并确保药物筛选结果的准确性;此外,采用串并联耦合的细胞共培养单元使得多细胞在同一流体环境中平行共培养,确保了细胞沉积的精确性及各区域内一致的化学和流体条件,从而有效降低了环境因素对药物筛选结果的干扰。综上所述,本文设计的微流控器件在浓度梯度生成、流场均一性和细胞共培养方面均展现出显著优势,为肿瘤靶向药物浓度筛选提供了一种简单、高效、可靠的技术平台,同时也为构建更接近体内环境的细胞培养模型、推动抗癌疗法和个性化治疗的发展提供了有力支持。

2 材料与方 法

2.1 实验材料及试剂

本研究所用的主要试剂和材料包括:聚二甲基硅氧烷(Polydimethylsiloxane, PDMS)预聚物及固化剂(按10:1比例混合,用于制备微流体芯片,两层PDMS厚度均为1 mm);上层芯片模具采用SU8光刻胶制备,下层芯片模具采用硅(Si)材料;用于药物浓度分布模拟的试剂包括浓度为 2 mol/m^3 的荧光素钠溶液和粒径为 $1\text{ }\mu\text{m}$ 的聚苯乙烯微球悬浮液;芯片内表面包被用的纤维连接蛋白(浓度 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$,来源Roche);细胞培养所用标准培养基由89% Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco), 10% 胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco)和1% 青霉素-链霉素(Penicillin-Streptomycin, PS, Gibco)组成;细胞来源包括购自ATCC的HeLa细胞以及购自中国科学院细胞库的A549细胞;此外,还使用兔抗人叶酸受体单克隆抗体(Abcam, 美国, 稀释比例1:500)和TRITC(Tetramethylrhodamine Isothiocyanate)标记的山羊抗兔免疫球蛋白抗体(Bio-world, 美国, 稀释比例1:150)进行细胞膜叶酸受体的检测;倒置荧光显微镜(Leica, 德国, DMD000B)观察细胞培养。Image Pro Plus 6.0进行图片分析。

2.2 微流控器件结构设计

靶向药物浓度筛选微流控器件由两部分功能单元组成,包括浓度梯度发生器(CGG)和细胞共培养单元。其中浓度梯度发生器的设计基于等效电路法,如图1(a)所示,采用等效电路模型对微流控通道内的流体流动进行建模,将其类比为电路中电流在电阻网络中的分布。

通过设定入口处的压力或流量,可以精确计算各分支通道内的流速。流速直接影响药物分子的对流传输与扩散过程:较高的流速会缩短流体在通道内的停留时间,导致药物分子扩散不足、混合效率降低,从而形成较为陡峭的浓度梯度;而较低的流速则有利于充分扩散,形成平滑且稳定的浓度梯度。与此同时,入口浓度作为初始条件,不仅决定了梯度的幅值和斜率,而且通过混合与分流作用,影响药物在各细胞培养单元内的最终浓度分布,而这种浓度分布又会直接作用于细胞的

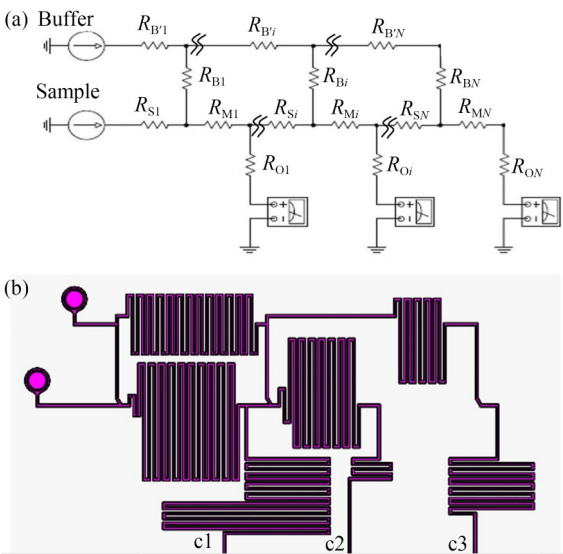


图 1 基于等效电路原理的 CGG 设计
Fig. 1 Design of the CGG based on the equivalent circuit

增殖、迁移及药物敏感性等生物学效应。

为实现样品浓度和流量的精确控制,本设计通过调节微通道长度来优化混合和稀释过程。具体而言,本文设计了一种能够同时生成三种浓度梯度的浓度梯度发生器(CGG),其浓度比例由左向右依次为 5:1:0,如图 1(b)所示。在该装置中,CGG 通道截面为矩形,宽度 300 μm ,深度 100 μm ,各通道长度见表 1(其中 C_i 表示混合后的各出口介质浓度)。

原始样品(浓度 C_0)与缓冲液作为恒定流量源共同进入混合系统,经过多级混合后,在各出口形成预设的浓度梯度。利用等效电路模型,通

表 1 通道长度			
Tab. 1 Length of microchannels			
i	1	2	3
C_i	$0.5C_0$	$0.1C_0$	0
L_{Si}/mm	10	3	/
L_{Bi}/mm	10	10	10
L_{Mi}/mm	300	200	3
L_{Bi}/mm	5	202	117
L_{Oi}/mm	242.6	42	119

过迭代应用基尔霍夫电压定律,我们能够确定每一级混合过程中的流量分布和浓度变化,其中通道长度 L 为唯一可调参数,通过精确调控 L 实现对混合和稀释过程的精细控制。根据设计要求,该浓度梯度比例为 5:1:0,对应出口浓度分别为 $C_1=0.5C_0$, $C_2=0.1C_0$ 及 $C_3=0C_0$ 。

该微流体器件由两层结构组成。上层为细胞进样层,包括一个培养液入口、一个药液入口、六个细胞入口、六条细胞进样通道、六个细胞出口和六个培养基出口;其中细胞进样口 1、进样口 3、进样口 5 为同一细胞株,细胞进样口 2、进样口 4、进样口 6 为另一种细胞株,用于实验不同细胞的共培养,从而验证纳米药物对不同细胞的靶向性以及细胞对药物浓度的敏感性。底层为细胞分析层,包含一个浓度梯度发生器和三个细胞共培养单元,如图 2(a)所示,一个细胞共培养单元连接一个浓度出口。细胞共培养单元采用串并联结构,由六个对称布置的细胞培养的单元组成。微流控器件内共有 18 个细胞培养单元,各细胞培养单元

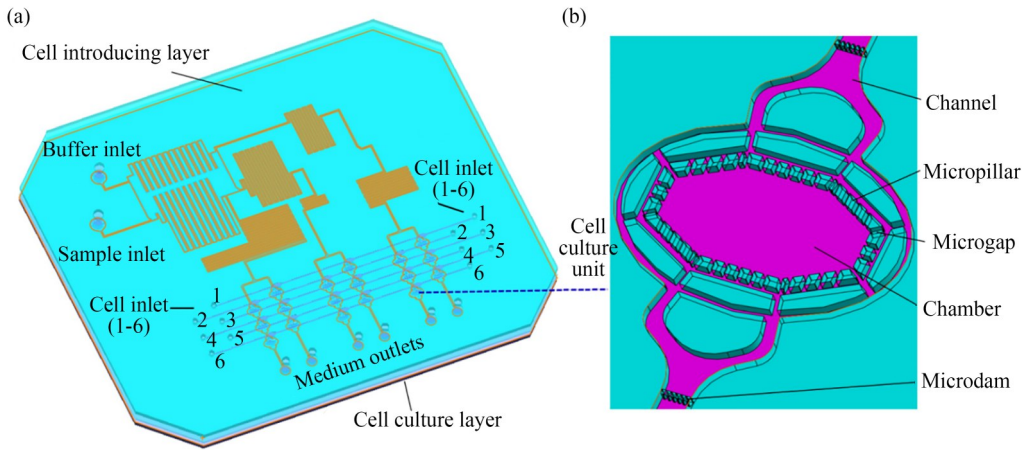


图 2 靶向药浓度筛选微流控器件结构示意图
Fig. 2 Structure of the microfluidic device used for concentration screening of targeted-drugs

结构一致,为细胞提供平行的流动环境。

细胞培养单元结构如图 2(b)所示,深度与浓度梯度发生器相同。前期研究表明,细胞培养腔周围设计多条流动路径有助于在培养室内建立均匀且稳定的流场^[14, 15]。本文中,细胞培养腔为内接椭圆长轴 2 mm、短轴 1 mm 的八边形结构,八边形培养腔周围阵列微间隙在培养腔与主流道之间形成多条流动路径。培养腔、微间隙和通道的深度均为 100 μm ,微间隙的环向宽度为 40 μm 。培养液从 CGG 通道流入细胞共培养单元的左右并联通道,在单串培养单元内通过分叉通道,最终通过微间隙以对流和扩散的方式进出细胞培养腔。主通道和分叉通道的水力直径遵循 Murray 定律,这种设计模仿了为细胞输送营养的血管结构。细胞培养单元之间设计线性阵列梯形微坝结构,两微坝间最小间隙为 5 μm ,用于分隔不同细胞入口进样的细胞,实现不同类型细胞的平行共培养。

2.3 微器件内流场模拟仿真

为了对微器件内流场进行评估,本文采用 COMSOL 软件中的层流物理场和稀释物质传递物理场耦合对微器件内浓度场和速度场进行模拟分析。基于层流 Poiseuille 流动 NS 方程 ($\rho(\partial u/\partial t + u \cdot \nabla u) = -\nabla p + \mu \nabla^2 u + f$) 构建了二维有限元模型。构建二维有限元模型。为了在细胞培养腔内构建近似于细胞在体的流动速度,给定浓度梯度发生器三个出口处流量 Q_{01} , Q_{02} 和 Q_{03} 均为 30 $\mu\text{l/h}$,由等效电路法计算出培养液入口和药液入口的流速分别为 $2.68 \times 10^{-4} \text{ m/s}$ 和 $6.7 \times 10^{-5} \text{ m/s}$ 。纳米粒子粒径常在 100 nm 以下,随着粒子粒径的增加,其在溶液中的扩散系数减小,本文选取粒径为 100 nm 的纳米粒子悬浮液作为仿真对象,扩散系数为 $3.3 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ ^[27]。仿真壁面条件无滑移,出口压力为 0。选择 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水作为流体材料。培养液入口的药液浓度为 0 mol/m^3 ,药液入口的浓度为 2 mol/m^3 。

2.4 微流控器件制作

文中的微流体芯片由两层聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 通过软刻蚀技术制备而成。上层和下层 PDMS 厚度均为 1 mm。制作过程如下:首先,利用光刻技术和干法刻蚀技术分别制作上层芯片 SU8 模具和下层芯片 Si 模具。为了提高 PDMS

的脱模效果,在使用模具之前需对制作的硅模具及 SU-8 模具分别进行 2 h 和 0.5 h 的硅烷化处理。PDMS 预聚物和固化剂比例为 10:1,混合后采用真空去气泡,在真空烘干箱中 80 $^{\circ}\text{C}$ 加热 1 h。

脱模后在上层芯片细胞培养液入口、药液入口、细胞进样口、细胞出样孔和废液出口分别打孔。上下两层采用氧等离子体灰化仪(参数 15 W, 30 s)处理后,使用视觉对准装置将上下两层结构对齐后键合。制备的微流控器件中的培养单元与微坝结构如图 3 所示。

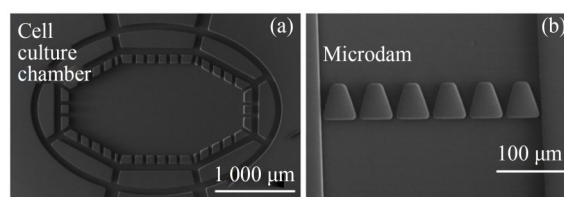


图 3 细胞培养单元和微坝 SEM 图

Fig. 3 SEM images of cell culture unit and microdam

2.5 微器件内药物浓度分布与粒子测速实验

为了药物浓度分布可视化与定量化,本文选用浓度为 2 mol/m^3 的荧光素钠溶液和聚苯乙烯荧光微球(粒径 1 μm)悬浮液模拟常用纳米颗粒药物,便于显微镜捕捉到流动状态。当微流控器件的结构尺寸、入口流速和物质浓度确定后,生成浓度的混合效果只与物质的扩散系数相关,扩散系数与物质粒径相关。纳米颗粒的扩散系数介于分子溶液与 1 μm 微球悬浮液之间。如果分子级溶液与微米级悬浮液均能在该器件的细胞共培养单元内生成稳定的浓度,可以验证本文设计的微流控器件适用于生成纳米级悬浮液药物浓度梯度。

采用 Matlab 软件对测得的荧光素钠溶液在浓度梯度发生器三个出口处的荧光图像进行荧光强度提取以及荧光数强度分布分析,验证该微流控器件在生成分子级溶液浓度梯度方面的可行性。

采用 Image Pro Plus 6.0 软件对测得的聚苯乙烯荧光微球悬浮液在浓度梯度发生器入口、分叉口和出口处的荧光图像进行分析,验证该微流控器件在生成微米级悬浮液浓度梯度方面的可行性。具体处理步骤如下:对图像进行阈值分割,将微球从背景中区分出来,从而提高计数的准确性。软件自动对每个采样区域内的微球进行计数,并进行人工核对,确保计数结果的准确

性。最后,统计不同位置的微球数量,进而验证浓度梯度分布的稳定性。

采用示踪粒子测速技术对培养单元内的流场特性进行了系统研究。具体实验步骤如下:利用CCD相机记录聚苯乙烯微球的运动图像,从培养单元内均匀选取20个代表性粒子,利用图像处理软件Image Pro Plus 6.0来分析处理粒子追踪图像,从而得到培养腔中流体的速度。

2.6 细胞培养及叶酸受体的测定

A549细胞相对于Hela细胞细胞膜表面叶酸受体较少,本文在同一微流控器件内共培养A549和Hela细胞,验证该器件的生物适用性和平行共培养性能,以适用于靶向药浓度筛选。

微流控器件高温蒸汽灭菌后烘干,包被浓度为 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ 的纤维连蛋白(Roche),培养箱中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h以增强细胞的附着。在引入细胞之前,向器件内注满含有89%培养基,10%胎牛血清和1%青霉素和链霉素的标准培养基,以去除多余的蛋白质和气体。在所有入口和出口处滴加培养基,以隔离微通道与大气。A549和Hela细胞密度均为 1×10^6 细胞/ml。细胞引入后,微流控芯片在5% CO_2 培养箱中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置6 h,保证细胞附着在培养腔底部。采用标准培养基注入

微器件。微流控器件连接到一个灌注系统,该系统包含内径为0.8 mm的硅胶管、两个注射泵和10 ml注射器。注射器中的培养基每24 h更换一次,流速分别为 $72\text{ }\mu\text{l/h}$ 和 $18\text{ }\mu\text{l/h}$ 。使用倒置荧光显微镜每24 h观察细胞培养。图片通过使用Image Pro Plus 6.0进行分析,并计数细胞数量。通过倒置荧光显微镜每隔24 h观察细胞培养情况。在微流控器件中培养78 h后,检测Hela细胞和A549细胞膜上的叶酸受体。通过细胞入口(1-6)注入 $300\text{ }\mu\text{l}$ 稀释比例为1:500的兔抗人叶酸受体单克隆抗体,并在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h。随后,注入 $300\text{ }\mu\text{l}$ 稀释比例为1:150的TRITC标记的山羊抗兔免疫球蛋白抗体,并孵育20 min。使用倒置荧光显微镜观察每个腔室内的荧光。

3 结果与讨论

3.1 微器件内流场仿真分析

浓度场:为验证设计的浓度梯度生成器(CGG)生成三种不同浓度的能力,进行了浓度分布的模拟实验。结果如图4(a)所示,成功生成了 2 mol/m^3 , 0.4 mol/m^3 和 0 mol/m^3 的浓度梯度,与设计预期高度吻合。这一结果表明,CGG能够

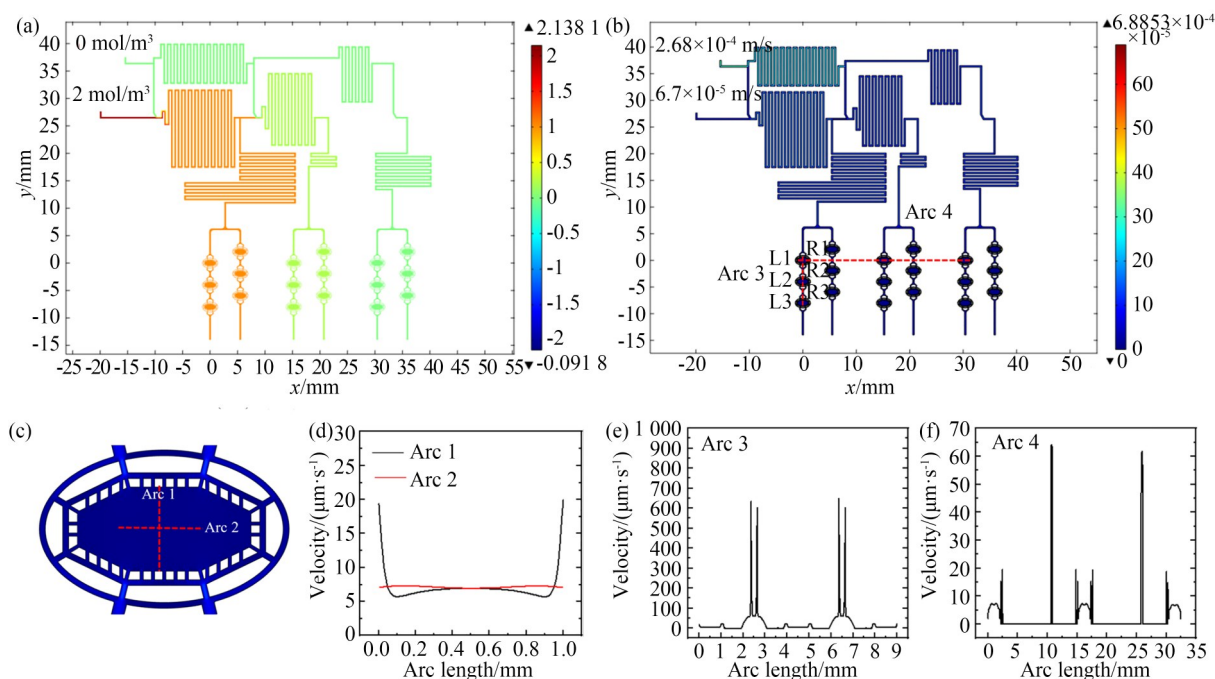


图4 微器件内速度场与浓度场仿真结果

Fig. 4 Simulation results of velocity and concentration fields in the microfluidic device

精确地控制并生成目标浓度,从而提高实验结果的可重复性和准确性。

速度场:利用COMSOL Multiphysics软件的层流物理场,对微器件内的速度场进行了分析,如图4(b)所示。

为了验证多通道培养腔对流场均一性的影响,对单个培养腔内的速度均一性进行了分析,如图4(c)所示,弧线1与弧线2上的线速度表明培养腔内速度均一,培养腔内平均流速为 $(7.1 \pm 0.3) \mu\text{m/s}$,如图4(d)所示,流场均一性定义为流速大小的一致程度,即沿截线上速度重合长度占截线总长度的比率图4(d)通过展示培养腔椭圆形截面(两端弧长1 mm)的流速分布,对弧线3和弧线4上的线速度进行数据提取,结果如图4(e)和图4(f)所示。结合图4(e)Arc 3和图4(f)Arc 4的流速特性,清晰说明18个培养腔内流场具有均一性。从而能够为纳米粒靶向性评估实验建立一个稳定而可靠的速度场。

3.2 微器件内药物浓度分布模拟分析

分子级药物溶液模拟:采用荧光素钠溶液模拟分子级的靶向药物溶液,通过倒置荧光显微镜可视化溶液浓度分布,如图5(a)所示。图5(b)展示了在芯片中不同位置(点1、点2和点3)的荧光分布曲线。通过对荧光强度进行对比分析,揭示了c1,c2和c3三个位置之间的显著荧光强度差异,表明浓度梯度的成功生成。此外,利用Matlab软件对氟荧酸钠的分布进行了定量分析,结果表明,设计的浓度梯度生成器(CGG)能够有效生成预期的5:1:0浓度梯度分布。

微米级药物悬浮液模拟:采用含有 $1 \mu\text{m}$ 粒径聚苯乙烯微球的悬浮液模拟微米级靶向药物悬浮液,通过倒置荧光显微镜可视化悬浮液中微球浓度分布,如图6(a)所示。图6(b)~图6(h)分别展示了在芯片中不同位置微球的分布(c0,c01,c02,c03,c1,c2)。通过对微球进行计数,可以得到该浓度梯度发生器能够有效生成5:1:0的浓度梯度。

实验结果表明,分子级溶液与微米级悬浮液均能在该器件内生成稳定的浓度,可以验证本文设计的微流控器件适用于生成纳米级悬浮液药物浓度梯度。

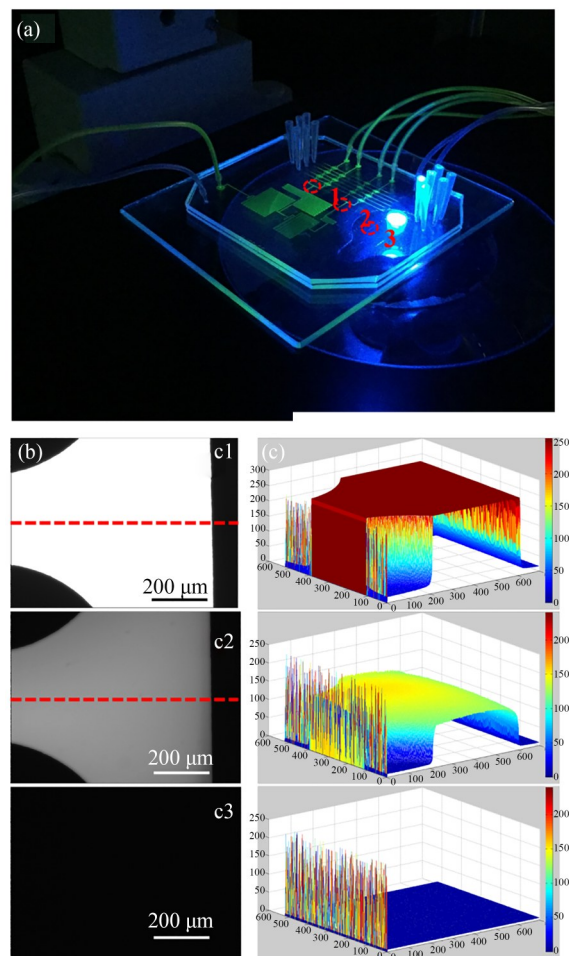


图5 荧光素钠溶液浓度分布

Fig. 5 Concentration gradients of fluorescein sodium solution

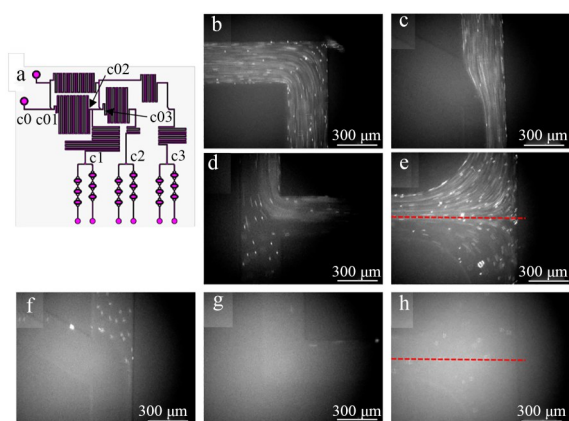


图6 聚苯乙烯微球悬浮液浓度分布

Fig. 6 Concentration gradients of polystyrene microsphere suspension

3.3 细胞培养单元内示踪粒子测速结果

为进一步验证细胞培养单元内流场的均一

性和稳定性,采用示踪粒子测速技术对培养单元内的流场特性进行了研究,结果如图7所示(彩图见期刊电子版)。

图7(a)中绿色线条为均布于培养单元内的20个荧光微球在5.5 s内的运动轨迹。结果表明,培养单元内粒子的运动方向与主通道流体流动方向高度一致,充分验证了流场方向的均一性。图7(b)呈现了20个聚苯乙烯微球在四个培养单元内

(图6C1浓度处左侧第一个细胞培养单元C1L1、右侧第一个细胞培养单元C1R1、图6C2浓度处左侧第一个细胞培养单元C2L1、右侧第一个细胞培养单元C2R1)的速度分布,速度值围绕 $40\text{ }\mu\text{m/s}$ 波动较小,清晰证实了流场的稳定性。图7(c)以柱状图形式展示了四个培养单元内粒子的平均速度,数值稳定在 $30\sim 50\text{ }\mu\text{m/s}$ 之间,各单元间速度差异微小,说明了培养单元内流速的均一性。

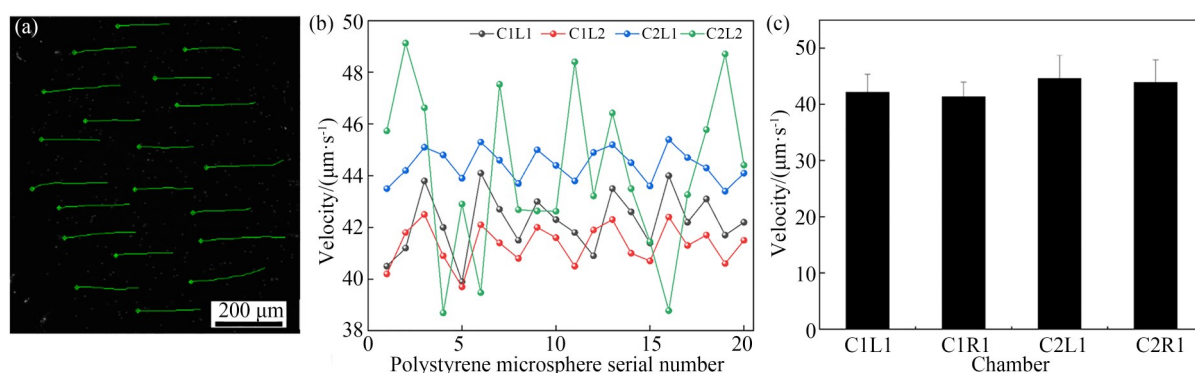


图7 培养单元流场均一性与稳定性分析

Fig. 7 Uniformity and stability analysis of flow field in culture unit

3.4 细胞增殖与叶酸受体的分布

细胞培养与增殖是进行药物浓度测试的基础,在微流控器件内对A549和Hela细胞进行了共培养,并对两种细胞在102 h内的生长曲线进行了统计,如图8(a)所示。结果表明,从培养30 h至78 h,两种细胞系的密度均显著增加,表现出标准的S型细胞生长曲线特征。在整个培养周期中,Hela细胞和A549细胞的相对增长率分别达到了443.1%和346.0%。这些结果表明,微流控芯片为Hela细胞和A549细胞的增殖提供了良好的环境。

细胞的平行共培养是研究药物靶向性的前提,为验证该器件对细胞进行平行共培养的性能,在微器件内进行了叶酸受体不同的A549细胞(叶酸低表达)和Hela细胞(叶酸高表达)的共培养,并研究了它们细胞膜上叶酸受体的分布情况,如图8(b)所示,红色荧光越强,表明细胞膜表面叶酸受体越多,即叶酸高表达(彩图见期刊电子版)。结果表明Hela细胞膜表面红色荧光明显高于A549细胞,说明在微器件内能够实现两种细胞的平行共培养,为纳米颗粒靶向药物筛选提供技术平台。

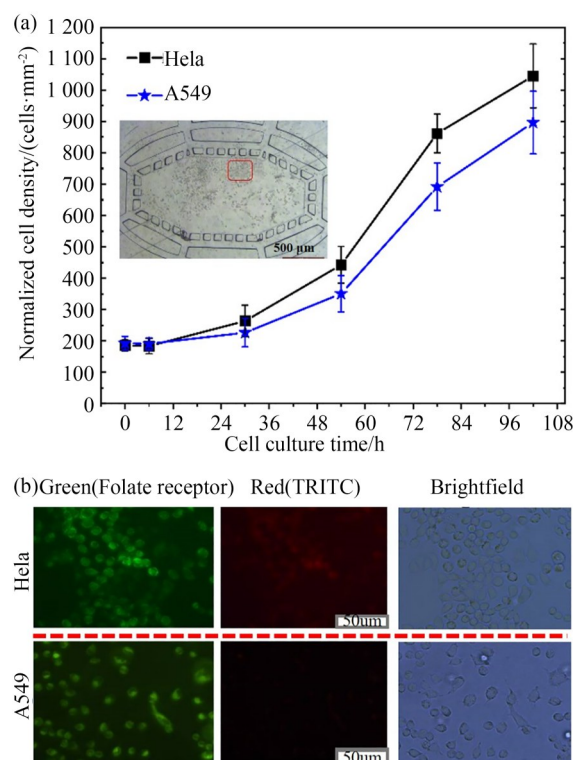


图8 微器件内Hela和A549细胞生长与叶酸表达

Fig. 8 Growth and folate receptor distribution of Hela and A549 cells cultured in the microfluidic device

4 结 论

本文开发了一种用于平行培养多种细胞系并测试靶向药物敏感性的微流控器件。该微流控器件包括CGG模块和左右分支对称分布的18个细胞培养单元。通过流场仿真与实验结果表明,设计制作的微器件能够在培养腔内提供均匀的速度场和稳定的浓度场。Hela细胞和A549细胞在微器件内的共培养验证了微器件的生物兼容性和适用性。最终结果表明,所设计的微流控器件能够模拟体内类似的流体微环境,并作为体外模型,有望用于靶向药物敏

感性的测试。这一技术为靶向药物筛选与多细胞系共培养的研究提供了一种便捷、精确的工具。

作者贡献声明:

霍兆林:论文构思,验证,可视化呈现,初稿写作;

丁来钱:方法论,验证,审核与编辑写作;

元东锋:调查研究,数据管理,获取资助;

刘冲:指导,审核,提供资源;

魏娟:指导,形式分析,审核,获取资助,提供资源。

参考文献:

- [1] CHAUHAN V P, STYLIANOPOULOS T, BOUCHER Y, *et al.* Delivery of molecular and nanoscale medicine to tumors: transport barriers and strategies[J]. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2011, 2: 281-298.
- [2] CHENG Z L, ZAKI AAL, HUI J Z, *et al.* Multifunctional nanoparticles: cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities[J]. *Science*, 2012, 338(6109): 903-910.
- [3] POLACHECK W J, ZERVANTONAKIS I K, KAMM R D. Tumor cell migration in complex microenvironments[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2013, 70(8): 1335-1356.
- [4] SUN Q H, ZHOU Z X, QIU N S, *et al.* Rational design of cancer nanomedicine: nanoproperty integration and synchronization[J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(14): 1606628.
- [5] CHAUHAN V P, STYLIANOPOULOS T, MARTIN J D, *et al.* Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner[J]. *Nature Nanotechnology*, 2012, 7: 383-388.
- [6] CHAUHAN V P, POPOVIĆ Z, CHEN O, *et al.* Fluorescent nanorods and nanospheres for real-time *in vivo* probing of nanoparticle shape-dependent tumor penetration[J]. *Angewandte Chemie (International Ed)*, 2011, 50(48): 11417-11420.
- [7] MEHRAJI S, DEVOE D L. Microfluidic synthesis of lipid-based nanoparticles for drug delivery: recent advances and opportunities [J]. *Lab on a Chip*, 2024, 24(5): 1154-1174.
- [8] WANG X Q, ZHU Y Z, CHENG Z M, *et al.* Emerging microfluidic gut-on-a-chip systems for drug development [J]. *Acta Biomaterialia*, 2024, 188: 48-64.
- [9] TONG S Y, NIU J Q, WANG Z T, *et al.* The evolution of microfluidic-based drug-loading techniques for cells and their derivatives [J]. *Small*, 2024, 20(47): e2403422.
- [10] YOUNG E W K, BEEBE D J. Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments [J]. *Chemical Society Reviews*, 2010, 39(3): 1036-1048.
- [11] TOMITA M, HIROSE S, NAKAMURA T, *et al.* pH-Dependent migratory behaviors of neutrophil-like cells in a microfluidic device with controllability of dissolved gas concentrations[J]. *Scientific Reports*, 2024, 14(1): 28730.
- [12] DING L Q, SUN D X, WANG Z Y, *et al.* Microfluidic device with an oxygen gradient generator for investigating effects of specific hypoxia conditions on responses of tumor cells [J]. *Langmuir*, 2024, 40(37): 19316-19323.
- [13] SOLIMAN B G, CHIN I L, LI Y W, *et al.* Droplet-based microfluidics for engineering shape-controlled hydrogels with stiffness gradient [J]. *Biofabrication*, 2024, 16(4): Biofabricationvol. 16, 410. 1088.
- [14] LI J M, WEI J, LIU Y C, *et al.* A microfluidic design to provide a stable and uniform *in vitro* microenvironment for cell culture inspired by the redundancy characteristic of leaf areoles[J]. *Lab on a Chip*, 2017, 17(22): 3921-3933.

- [15] WEI J, LIU C, JIANG Y, *et al.* Uniform, stable supply of medium for in vitro cell culture using a robust chamber[J]. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2018, 28.
- [16] WEI J, LIU C, JIANG Y, *et al.* Microfluidic device for generating regionalized concentration gradients under a stable and uniform fluid microenvironment[J]. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2019, 29(1): 015008.
- [17] WEI J, CHENG L C, LI J M, *et al.* A microfluidic platform culturing two cell lines paralleled under *in-vivo* like fluidic microenvironment for testing the tumor targeting of nanoparticles[J]. *Talanta*, 2020, 208: 120355.
- [18] 江洋, 刘冲, 魏娟, 等. 微流控芯片细胞动态培养装置的设计与制作[J]. *光学精密工程*, 2019, 27(9): 2020.
- JIANG Y, LIU C, WEI J, *et al.* Design and fabrication of device for cell dynamic culture in microfluidic chip[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2019, 27(9): 2020. (in Chinese)
- [19] HAN C, ZHANG R C, HE X W, *et al.* A digital manufactured microfluidic platform for flexible construction of 3D co-culture tumor model with spatiotemporal resolution[J]. *Biofabrication*, 2024, 17(1): Biofabricationvol. 17, 110.
- [20] 刘冲, 刘涛, 魏娟, 等. 细胞三维动态培养微器件的设计与制作[J]. *光学精密工程*, 2018, 26(7): 1672-1679.
- LIU C, LIU T, WEI J, *et al.* Design and fabrication of three-dimensional dynamic cell culture micro-devices [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2018, 26(7): 1672-1679. (in Chinese)
- [21] JEON N L, DERTINGER S K W, CHIU D T, *et al.* Generation of solution and surface gradients using microfluidic systems [J]. *Langmuir*, 2000, 16(22): 8311-8316.
- [22] LI E C, XU Z Y, LIU F, *et al.* Continual exposure to cigarette smoke extracts induces tumor-like transformation of human nontumor bronchial epithelial cells in a microfluidic chip[J]. *Journal of Thoracic Oncology*, 2014, 9(8): 1091-1100.
- [23] WANG J C, BRISK P, GROVER W H. Random design of microfluidics [J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(21): 4212-4219.
- [24] LIU R R, MENG X T, YU X Y, *et al.* From 2D to 3D co-culture systems: a review of co-culture models to study the neural cells interaction[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(21): 13116.
- [25] JASTRZEBSKA JEDRYCH E, GRABOWSKA-JADACH I, CHUDY M, *et al.* Multi-function microsystem for cells migration analysis and evaluation of photodynamic therapy procedure in coculture [J]. *Biomicrofluidics*, 2012, 6(4): 44116.
- [26] LIU X Y, CHENG J X, ZHAO Y C. Tumor microenvironment based on extracellular matrix hydrogels for on-chip drug screening [J]. *Biosensors*, 2024, 14(9): 429.
- [27] 计光华, 计洪苗. 微流动及其元器件[M]. 北京: 高等教育出版社, 2009.
- JI G H, JI H M. *Microfluidic Theory and Elements* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2009. (in Chinese)

作者简介:



霍兆林(1999—),男,山东滨州人,硕士研究生,现就读于山东理工大学机械工程学院,主要从事微流控器件设计。E-mail: huozhaolinsdut@163.com

通讯作者:



魏娟(1988—),女,山东济宁人,讲师,硕士生导师,2020年于大连理工大学取得工学博士学位,主要从事细胞分析微流控器件、器官芯片、聚合物POCT芯片的设计与研发。E-mail: weijuan@sdut.edu.cn