

综述

微流控芯片技术在细胞生物学研究中的应用进展

姚琳 白亮 吴亮其 丁永胜*

(中国科学院研究生院生命科学学院, 北京 100049)

摘要 20世纪90年代以来, 微流控芯片技术得到了快速发展。由于具有小型化、集成化、高通量、低消耗、分析快速等特点, 微流控芯片作为一种新型的生物学研究平台, 能够提供传统方法不具备的精细和可控制的细胞研究条件, 在细胞生物学研究领域中得到了广泛关注。该文主要介绍其在细胞培养、分选、裂解、计数、凋亡检测、迁移、单细胞捕获、细胞间作用等方面的研究进展。

关键词 微流控芯片; 细胞培养; 细胞分选; 细胞裂解; 细胞计数; 细胞凋亡; 细胞迁移; 单细胞捕获; 细胞间作用

1 前言

微流控芯片(microfluidics)又称芯片实验室(lab on a chip), 是将化学和生物等领域所涉及的样品制备、反应、分离和检测等基本操作单元集成到几个平方厘米大小的具有微米级通道结构的芯片上, 采用可控流体, 完成常规化学和生物实验室的各种功能的一种微技术平台^[1]。微流控芯片具有小型化、集成化、高通量、低能耗、分析快速等特性。自20世纪90年代初, 微流控芯片以芯片毛细管电泳的形式出现以来, 目前已广泛应用于生物、医学、环保和新药研究等领域。

有别于以静态亲和杂交为基础的传统生物芯片, 微流控芯片采用微流体控制技术, 为动态生物分析提供了一个崭新的技术平台。微流控芯片在生物领域的应用可分为分子水平和细胞水平。细胞是生物体结构和功能的基本单位, 一切有机体(除病毒外)都由细胞构成, 对细胞的深入研究是揭开生命奥秘和治疗疾病的关键所在。虽然以毛细管电泳和流式细胞仪为代表的细胞分析仪器被普遍应用, 但功能单一, 而且存在各自的不足。例如, 毛细管电泳不易对细胞操控和处理, 流式细胞仪耗费大量样品等。微流控芯片在细胞学研究方面具有以下一些优点: 第一, 微流控芯片通道尺寸(10~100 μm)与单个细胞直径(10~20 μm)大小相近^[2], 便于对细胞进行操控; 第二, 微流控芯片的多维网络结构形成相对封闭的环境, 更接近生理状态下细胞的生存环境; 第三, 微流控芯片可以满足高通量细胞分析的需要, 可同时获取大量的生物学信息^[3]; 第四, 微流控芯片上多种

操作单元灵活组合, 使得细胞进样、培养、捕获、裂解和分离检测等过程在一块芯片上即可完成; 第五, 微流控芯片为平板式几何构型, 更方便进行观察^[4]; 第六, 芯片上传热和传质快, 有利于热量和物质的扩散。由于微流控芯片能在试验条件下模拟生理条件, 为在单细胞和多细胞水平更好地研究细胞提供了一个全新的技术平台^[5]。本文对近年来微流控芯片在细胞生物学研究中的主要应用, 包括细胞的培养、分选、裂解、凋亡、计数、迁移、单细胞捕获和细胞间相互作用等进行了综述。

2 微流控芯片在细胞生物学研究中的应用

2.1 细胞培养

细胞培养是细胞生物学、组织工程、生物医学工程和药物开发中的关键步骤。在传统的体外细胞培养中, 细胞多为贴壁和二维生长, 由于离体后的细胞失去了神经体液的调节和细胞之间的相互作用, 而且处于相对静止的环境中, 所以细胞除了增殖外并没有像在体内那样发挥其作用, 也不能真实反映其在体内的生存情况^[6]。微流控芯片和传统的体外细胞培养相比, 具有很多优点, 诸如: 精确控制物质浓度、溶液温度和pH值等细胞微环境要素^[7]; 提供微小和复杂的结构来模拟细胞在体内的生存环境;

收稿日期: 2011-05-09 接受日期: 2011-07-12

中国科学院生物局“十二五”基础前沿专项(No.KSCX2-EW-J-29)资助项目

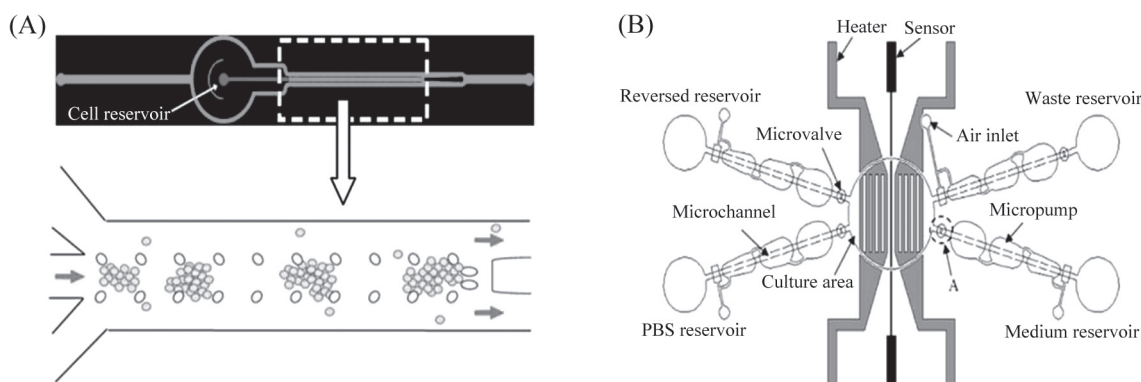
*通讯作者。Tel: 010-88256392, Fax: 010-88256079, E-mail: dingysh@gucas.ac.cn

提供三维生长环境以模拟细胞在体内的状态, 考察细胞的行为(如基因表达、受体作用和其它生命活动)等^[8]。在哺乳动物组织中, 细胞的生长受到多方面因素的影响, 不仅细胞之间存在相互作用, 细胞与胞外基质也有密切联系, 同时细胞还受到各种自分泌、旁分泌及激素等信号分子的作用。因此建立细胞体外三维培养环境, 需要将细胞植入模拟细胞外基质的培养环境中^[9]。目前有天然和合成的水凝胶已被成功整合到芯片上, 但与此同时也出现一些问题, 如操作复杂和阻碍物质的传输^[10-11]。为解决这些问题, Ong等^[12]设计了椭圆形微柱阵列的芯片(图1A)。细胞预先用高碘酸钠处理, 使其表面的糖蛋白产生醛基, 再与培养液中的聚乙烯亚胺酰肼(polyethyleneimine-hydrazide)连接物结合形成三维生长结构, 最后, 用钙黄绿素和碘化丙啶染色后, 观察细胞的生长情况。另外, Huang等^[13]设计了一款自动培养细胞的芯片(图1B), 通过设置气动微泵和微阀使培养液和缓冲液流入细胞培养区域, 同时将代谢废物排出。芯片中的栅栏形微型加热器和温度感应器能提供一个较恒定的温度($37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)。羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)缓冲液则为细胞生长提供适宜的pH条件。Nevill等^[14]设计制备微流控芯片, 将细胞培养和电化学裂解功能结合在一起, 对细胞中的蛋白(p53和HRP)进行分析, 大大降低了分析时间和

成本。在微流控芯片上还可以进行肝、肺细胞和组织培养, 构建体外毒理实验模型^[15]。除此之外, 微流控芯片还可以用于干细胞和癌细胞的培养。由于干细胞生活在复杂的物理、化学和生物因素下, 传统的培养方法不能很好地模拟其生理环境, 并受到各种限制, 而微流控芯片技术可以更好地模拟干细胞在体内复杂的生活环境, 以高通量和可变方式精确控制各种参数^[16]。癌细胞最大的特点是侵袭和转移, 利用微流控芯片可以模拟癌细胞渗入血管、在血管内随血液循环流动、渗出血管和迁移到靶组织等一系列过程^[17]。由此可见, 采用微流控芯片来培养细胞将成为细胞生物学研究的一个重要手段。

2.2 细胞分选

细胞分选是从非均一细胞体系中筛选出性质均一细胞的技术, 在细胞免疫学和临床诊断中具有非常重要的作用。目前最常用的细胞分选方法有磁珠免疫法和流式细胞仪法, 其中磁珠免疫法对细胞表面有特异性要求, 而流式细胞仪虽然能对细胞进行快速可靠的分选, 但其体积庞大、价格昂贵、难以灭菌。除此之外还需要专业人员操作和复杂的前处理过程, 并伴随大量的样本消耗^[18-19]。为了弥补这些缺陷, 有报道将流式细胞仪的主要部件与微流控芯片结合起来^[20], 从而实现小型化和低成本分选细胞。目前, 以微流控芯片技术为平台的细胞分选



A: 非水凝胶3D微流控细胞培养体系包括两个入口(一个是培养基入口, 另一个是细胞灌注入口)和一个出口。微坝结构将微流控通道分为中心细胞培养室和两边用来扩散培养基的通道两部分; B: 细胞自动培养体系图解说明, 此体系由一个细胞培养室, 四个微泵、四个微阀、微通道、储液池、两个加热器和一个微型温度传感器组成。(参照参考文献[12-13]修改)

A: the gel-free 3D microfluidic cell culture system has two inlets (one for culture medium infusion, one as cell reservoir) and one outlet. Micropillars divided the microfluidic channel into a central cell culture compartment and two side channels for perfusion of culture medium; B: schematic illustration of the automatic cell culture system. It is composed of a cell culture area, four micropumps, four microcheck valves, microchannels, reservoirs, two heaters and a micro temperature sensor. (Modified from reference [12-13])

图1 微流控细胞培养体系

Fig.1 Microfluidic cell culture system

方法主要有两种: (1) 以微结构和层流为基础的被动分选; (2) 以各种外力(如磁力、介电电泳力、电力等)驱动的主动分选^[21]。

2.2.1 以细胞大小为基础的过滤分选 借助微型机电系统(MEMS)技术, Chen等^[22]设计和制造的立柱型和堤坝型过滤芯片, 依靠平行的微立柱和微坝尺寸大小来分离细胞。图2A所示的聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)芯片利用红细胞与白细胞体积大小的差异将红细胞从大鼠全血中分离出来^[23], 在主通道的垂直方向设置了微型堤坝, 两者存在5 μm 的高度差, 当缓冲液沿垂直主通道方向灌流时, 红细胞被冲到侧面, 经过微型堤坝结构流入收集池里。图2B所示芯片在主通道内两侧设计了两排直径20 μm 、间隔6.5 μm 的立柱^[24], 圆饼状、体积较小的红细胞能通过立柱间的缝隙进入两边的通道, 而圆球状的体积较大的白细胞则留在主通道内, 从而达到分选效果, 与此同时, 连续流动的溶液将白细胞冲到出口处, 避免微通道发生堵塞。

2.2.2 受介电电泳作用的细胞分选 介电电泳是指本身不带电、但可以发生不同程度极化的颗粒在非均匀的电场中移动的现象^[25]。与电泳分离不同, 介电电泳不是依靠粒子的荷质比, 而是依据不同介电性质对颗粒进行分离。当处于非均匀电场时, 细胞产生极化现象, 其表面会发生偶极矩作用^[26], 进而细胞在介电电泳力作用下, 向高场强(正向介电电泳)或低场强(负向介电电泳)方向移动^[27]。由于细胞的大小、形状、介电性质不同, 细胞所受介电电泳力的大小和方向也不尽相同, 因此可对细胞进行分选。以微流控芯片介电电泳为基础的分选技术具有很多优点: (1) 所需技术成本低; (2) 不需要对细胞表面进行修饰^[28]; (3) 操作简便; (4) 特异性高^[29]等。基于以上优点, 在微流控芯片上进行介电电泳已被广泛应用于细胞分选^[30]。Nascimento等^[31]利用芯片介电电泳对受寄生虫侵染和未被侵染的红细胞进行分选。当红细胞受到侵染后, 其细胞膜的结构和表面抗原会发生变化, 细胞膜通透性提高, 使两种细胞在电场中受力大小和方向不同, 导致运动方向发生改变, 进而获得分离。为了在芯片上实现介电电泳必须产生非均匀电场, 如图2C所示, X型的绝缘结构用于产生非均匀电场, 通过改变电压和液体流速, 收集HeLa细胞^[32]。Pommer等^[33]在微流控芯片上设计了两个非均匀电场, 对样品中的细胞进行串联介电电

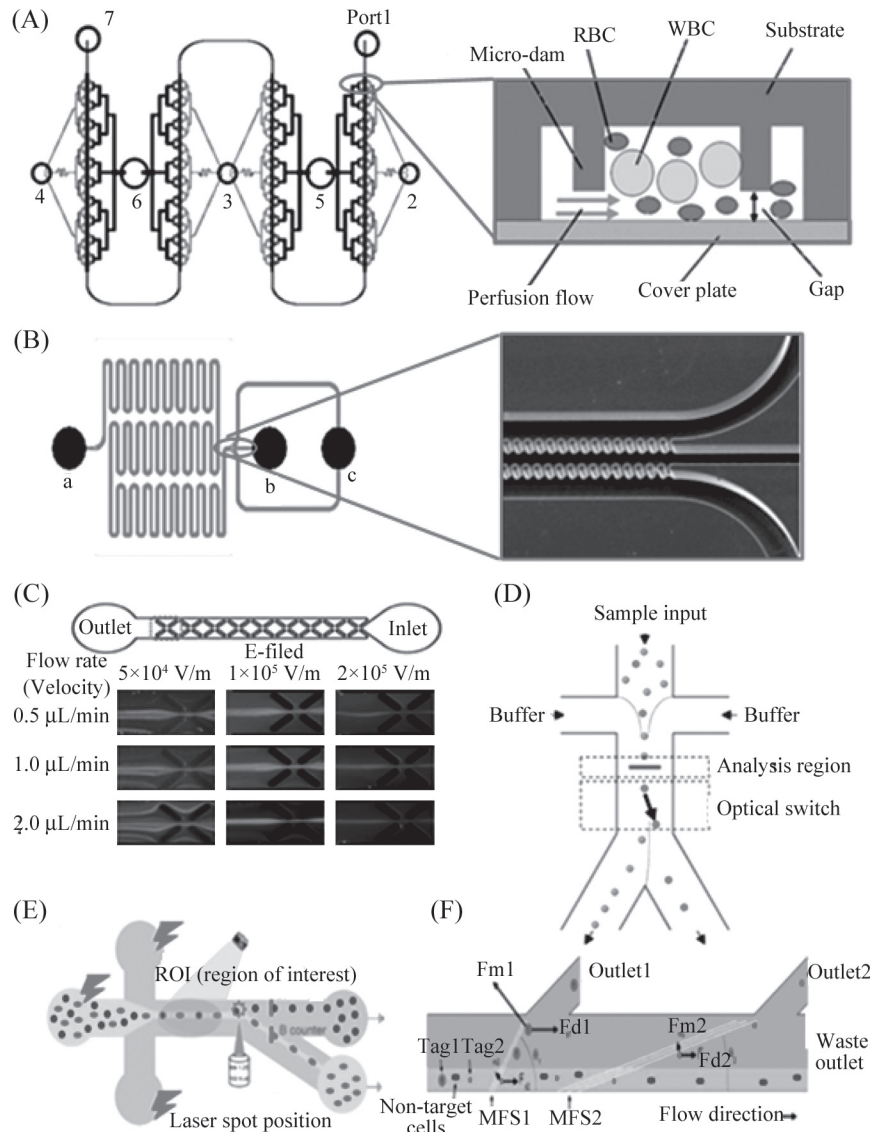
泳分离, 从全血样品中获得了纯度为95%的血小板。

2.2.3 光驱动的细胞分选 用光作用力进行细胞分选主要有荧光激发和光镊两种形式^[34]。荧光激发的细胞分选是将目标细胞预先进行荧光标记, 经过检测区域时目标细胞被识别, 在激光束作用下使目标细胞进入选择通道。Wang等^[35]在微流控芯片上以荧光激发的方式, 将被绿色荧光蛋白基因转染的HeLa细胞分选出来, 如图2D所示, 当样品流经检测区域时, 光电二极管检测到细胞的存在, 接着光电倍增管对细胞所发荧光进行分析, 声光调制器触发光学开关将表达绿色荧光的HeLa细胞送入收集通道。光镊是一种光效应, 激光聚集可形成光阱, 微小物体受光压而被束缚在光阱处, 移动光束使微小物体随光阱移动, 借此可在显微镜下对微小物体操控。如图2E所示, 在光镊芯片上, 细胞样本被数字成像系统检测、识别、追踪, 以产生的可控信号为基础, 利用激光光镊, 目标细胞自动转入邻近的鞘流, 最终被分流到下游收集区域^[36]。

2.2.4 磁性细胞分选 磁性分选在芯片细胞分选中尤其受欢迎, 因为磁力对细胞活力的影响最小^[37]。磁性细胞分选的原理是: 在目标细胞表面包裹磁性微粒^[38]或将磁性纳米颗粒引入细胞内部^[4], 从而使其带上磁性标签, 当带有磁性标签的细胞流经磁场区域时, 磁力使目的细胞偏离原来的运动轨道^[39]。由于不同细胞的大小、磁化率、流速不同, 细胞偏离原来层流方向的程度不同, 从而将细胞分选出来^[40]。微流控芯片上的磁性细胞分选可以实现对两种及多种细胞的分选, 可以将待分选的细胞用磁性标签标记, 其余细胞不做标记, 当目标细胞流经磁场区域时运动方向发生改变, 从而被分离出来^[41]; 也可以将多种细胞施加不同磁性标签以达到分选目的。Adams等^[42]就在微流控芯片连续层流基础上实现了同时对多种细胞进行空间定位分选, 如图2F所示, 细胞在进样之前用不同磁性标签标记, 流经磁场区域时, 不同细胞在磁力和流体驱动力的合力作用下流向不同的收集通道, 最后在收集通道将细胞用洗脱液洗脱出来, 从而达到细胞分选的目的。

2.3 细胞裂解

细胞裂解是对细胞内物质(核酸、蛋白质、信号小分子等)进行分析的关键步骤^[3]。根据细胞破裂的原理可将细胞裂解方式分为以下几种: 物理裂解、化学裂解、电裂解^[43]。物理方法主要指采用冷冻、



A: 用于分选血细胞的PMMA微流控芯片。左图为微流控芯片整体示意图, 共有7个口, 1: 注血口; 2-4: 缓冲液注入口; 5,6: 红细胞收集口; 7: 废液口。右图为分选区域局部放大图; B: 用于分选细胞的连续流动微流控芯片。左图为立柱型分选血细胞芯片概略图, a: 血液样品注入口, b: 白细胞收集口; c: 红细胞和血浆收集口; 右图为装置末端微立柱阵列扫描电镜图; C: 负向介电泳分离HeLa细胞的微流控芯片; D: 荧光激发的微流控芯片细胞分选示意图, 细胞流经中心通道时, 经过分析转换, 靶细胞流向收集口, 而其他细胞流入废液口; E: 自动化细胞分选系统设计图。当细胞通过兴趣区时, 数字图像处理系统产生信号, 激发激光光镊, 将目的细胞从样品中分离出来; F: 多靶标磁性细胞分选结构。样品中含有过量的非目标细胞和2个不同的靶细胞(目标1和目标2), 靶细胞分别用特定标签(标签1和标签2)标记, 细胞在MFS 1和MFS 2产生高梯度磁场区域发生分离。(参照参考文献[23-24,32,35-36,42]修改)

A: PMMA microfluidic devices for blood cell filtration. Overview of the blood cell sorting chip (left). There are seven ports. 1: blood injection port; 2-4: buffer injection port; 5,6: RBCs collection port; 7: outlet port. Partial enlarged drawing of the sorting area (right). RBC refers to red blood cell; WBC refers to white blood cell; B: continuous flow microfluidic device for cell separation. Schematic of the pillar type for blood cell sorting (left), a-blood sample injection port; b-white blood cell collection port; c-red blood cell and plasma collection port. SEM of micropillar array in the regions close to the end (right); C: the negative dielectrophoresis microfluidic chip for the focusing of HeLa cells; D: the schematic fluorescence-activated microfluidic cell sorter. After being aligned to the center of the channel, cells are analyzed and then switched. Target cells are directed to the collection output while all other cells flow to the waste output; E: design concept of the proposed automatic system for cell sorting. When cells flow through the region of interest (ROI), signals generated by the digital image processing (DIP) system used to actuate a single beam optical tweezer to extract the target cells from main sample flow stream; F: the multitarget magnetic activated cell sorter separation architecture. The sample contains an excess of nontarget cells and 2 different target cells (target 1 and target 2) that are labeled with two different magnetic tags (tag 1 and tag 2) by specific surface markers. Separation occurs in 2 regions of high magnetic field gradient generated by the microfabricated ferromagnetic strip (MFS 1 and MFS 2). (modified from reference [23-24,32,35-36,42])

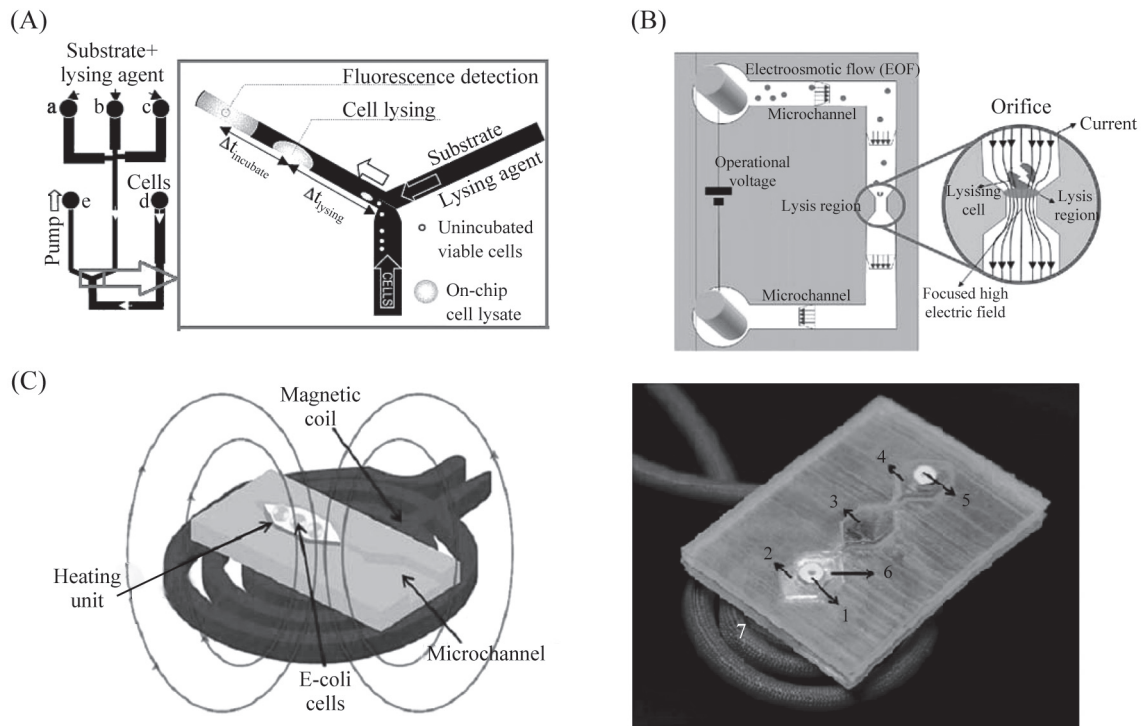
图2 用于细胞分选的微流控芯片
Fig.2 Microfluidic chip for cell sorting

渗透压、剪切力^[44]和超声波等破碎细胞。化学方法则指用酶或表面活性剂处理细胞膜,从而使细胞裂解。电裂解法是使用电脉冲或连续的直流电,将细胞破碎。

化学裂解中常用的使细胞膜变性的试剂有Triton X-100、盐酸胍、蛋白酶和十二烷基磺酸钠(SDS)。图3A为采用化学试剂进行细胞裂解的芯片,在a-c口分别加入磷酸盐缓冲液(PBS)和裂解液SDS、Triton X-100,在d口加入胎牛血清,继而引入要裂解的细胞,细胞在图中通道交叉处裂解,细胞裂解物在下游被检测^[45]。但化学裂解法会将细胞器膜一起破坏,不适用于亚细胞结构分析,除此之外还需要对细胞裂解物进行分离纯化,操作相对麻烦,裂解试剂的使用还可能干扰下游对目标物质的检测。

细胞膜的双层结构是绝缘的,但暴露在电场中

的细胞会产生一个跨膜电势,当跨膜电势超过大约1 V时细胞便会发生裂解。Lu等^[46]在芯片上设计了锯齿状电极,并使用交流电对细胞进行裂解,通过控制电压大小及频率,使细胞膜破裂而细胞器膜保持完整,为在亚细胞水平进行分析提供了可能。细胞膜一般需要在较高外加电场强度下(约1 000 V/cm左右),才能获得大约1 V的跨膜电势而发生裂解。由于细胞进样需要在较低电场强度条件下, Lee等^[47]通过改变微流控芯片通道的宽度解决了这一问题,如图3B所示,他们将细胞裂解区通道宽度较其它区域缩小20倍,则该区域的电场强度则达到其它区域的20倍,从而实现了细胞的低场强进样,高场强裂解。一般的细胞电裂解使用的都是二维电极,对细胞膜产生不均一的力作用,有人采用了高50 μm 、直径50 μm 的三维柱形电极对白细胞进行裂解,可以极大地提



A: 微流控芯片裂解和孵育HL-60细胞示意图,裂解液和作用物从a-c口注入,细胞从d口注入,荧光探测器和显微镜位于下游交叉处; B: 采用低直流电压连续裂解细胞装置,微通道宽度为200 μm ,裂解处孔的宽度为10 μm ; C: 无线感应生热裂解细胞芯片示意图,将边长6 mm的六边形金属片整合到两层PDMS中间,整个装置包括一个入口(1),三个小室(2-4),一个出口(5),加热元件(6)和感应线圈(7)。(参照参考文献[45,47,50]修改)

A: scheme of on-chip lysing and on-chip incubation of HL-60 cell with substrate. Substrate and lysing agents were placed in ports a-c. Cells were placed in port d. A fluorescence detector was located downstream of the mixing point, and an observation microscope sat over the intersection; B: a continuous electrical cell lysis device using a low dc voltage. The width of the microchannel is 200 μm , while the orifice's width is 10 μm ; C: scheme of wireless induction heating device for cell lysis. A metal heating unit with hexagonal shape of 6 mm of side length was embedded between two layers of PDMS. The microfluidic system consists of one entry (1), three chambers (2-4), one outlet (5), a metal heating element (6) and induction coil (7). (modified from reference [45,47,50])

图3 细胞裂解装置示意图

Fig.3 The schematic view of the cell lysis device

高裂解效率^[48]。细胞电裂解可在短时间达到裂解效果,最快可达33 ms,比SDS裂解的速度快8倍^[49]。

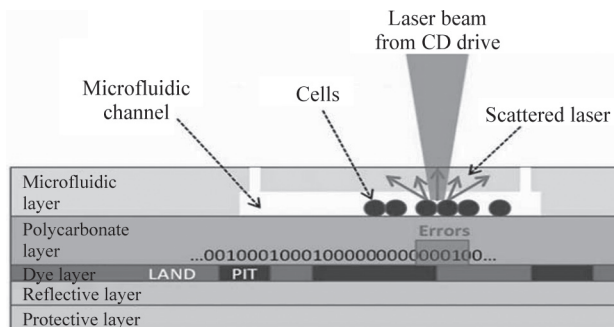
电裂解在高效快速的同时也存在一些弊端,如电极寿命短、操作过程复杂、需要外加电源。为克服这些缺点, Baek等^[50]设计了一种无线感应生热裂解细胞的装置,如图3C所示,芯片底部放置一个直径6 mm粗的感应线圈,两层PDMS中间有厚度为100 μm的六边形金属薄片,感应线圈通电后,通过电磁感应现象,金属薄片发热,进而将上层芯片小室中的细胞裂解。

2.4 细胞计数

培养的细胞在一般条件下要求有一定的密度才能生长良好,因此要进行细胞计数。细胞计数通常与细胞分选、裂解等功能一起整合到微流控芯片上。对细胞计数,常使用的方法有荧光检测、数字图像处理技术(CCD图像传感器)和阻抗测量^[51]。前两种方法主要是将流式细胞仪与微流控芯片结合起来,细胞用特殊荧光素标记,受激发后产生荧光,经光电转换器转换成电信号计数细胞^[52-53]。利用阻抗测量的方法也可以在芯片上实现对血细胞的计数^[51],当细胞流经检测区域时,溶液电导率、电容、电阻发生变化,产生脉冲信号,脉冲信号的多少即反应了细胞数量的多少^[54]。除此之外,还可在芯片上嵌入一对光纤,当细胞流经两纤维之间时,光被挡住,这一信号被捕捉并转化成电信号,对流过的细胞进行计数^[55]。CD4⁺ T淋巴细胞的计数在HIV阳性患者的检测中起着重要的作用^[56],目前,利用上述方法已经成功实现了在微流控芯片上对CD4⁺ T淋巴细胞的计数,但检测前需在通道中注入单克隆抗体以捕捉T细胞^[57]。Imaad等^[58]还设计了一种新颖的装置来实现细胞的计数,如图4所示,他们将PDMS与光碟(compact disc, CD)整合在一起,将二进制数据写到光盘上,用相应的输出数据组成音频文件,将音频文件刻录到可录光碟中,当有细胞出现时便会采集到错误数据,以此来实现细胞计数。

2.5 细胞凋亡

细胞凋亡是一种特殊的细胞程序性或自杀性死亡^[59],通过消除体内不需要的细胞来维持组织稳态和调节免疫应答^[60]。增强或抑制细胞凋亡可导致发育缺陷、自身免疫缺陷病和神经退行性病^[61]。细胞凋亡除了在胚胎和大脑发育过程起调节作用外,还与很多疾病有关,包括心脏病和癌症^[62]。伴随



装置包括5层: PDMS层、聚碳酸酯薄层、光敏染料层、金属反射层和塑料保护层。(参照参考文献[58]修改)。

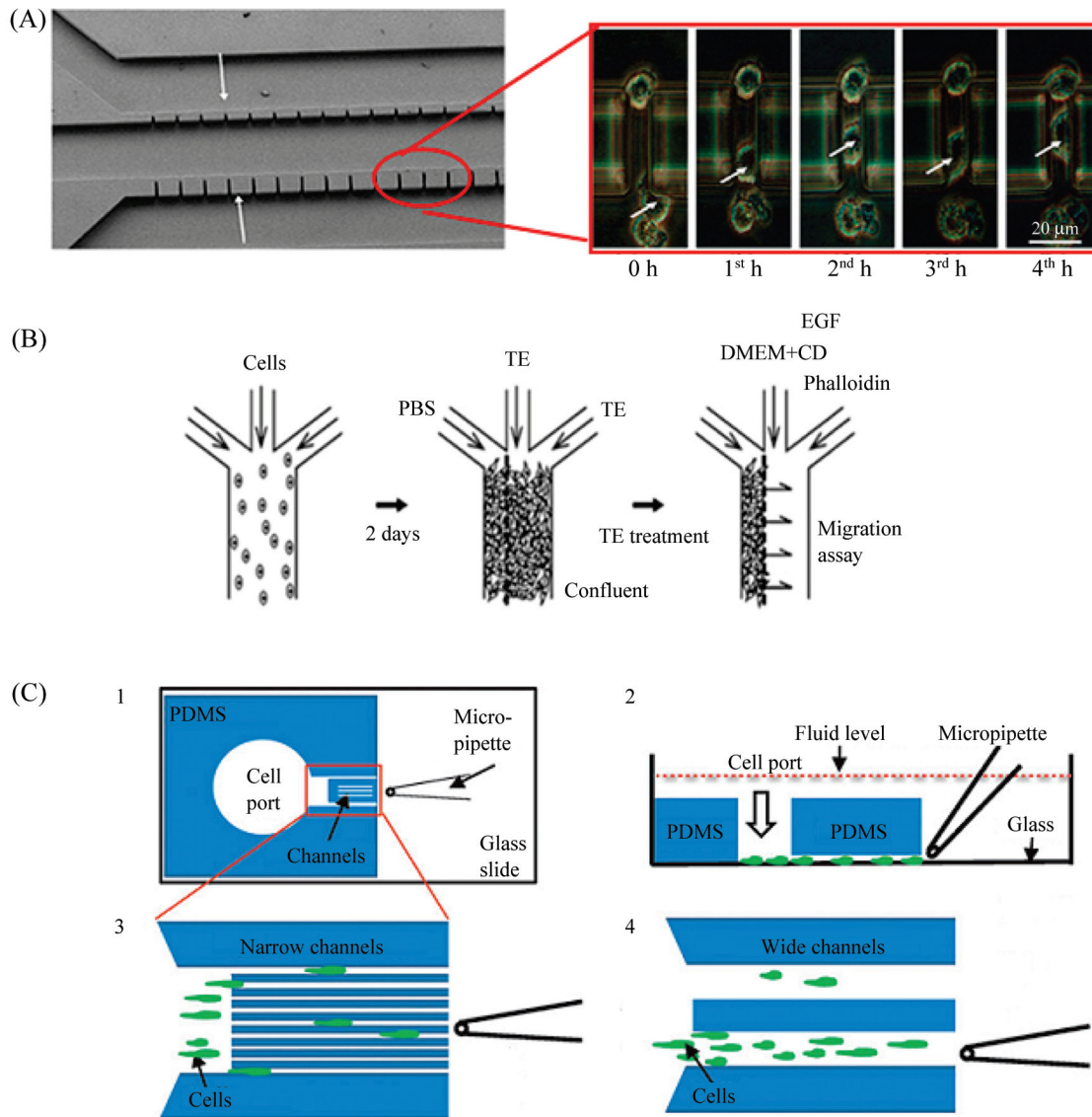
This device consists of five layers including PDMS microfluidic layer, thin polycarbonate layer, photosensitive dye layer, metallic reflective layer and plastic protective layer. (modified from reference [58]).

图4 微流控芯片细胞计数研究

Fig.4 The study of cell counting on microfluidic

着细胞凋亡过程,细胞形态和功能会发生变化,如细胞皱缩、核质浓缩、线粒体外膜跨膜电势消失、通透性改变、释放细胞色素C到胞浆、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase)激活^[63]、细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻,最终形成凋亡小体^[64]。

细胞凋亡过程中DNA会形成长度为50~300 Kb的片段^[65],依据这一特征Klepárník等^[66]设计了一款芯片用于检测多柔比星(doxorubicin)诱导的心肌细胞的凋亡,细胞在碱性环境下裂解,用溴化乙锭标记DNA,电泳分离后在共聚焦显微镜下观察DNA片段长度,以此来判断细胞凋亡的程度。半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspase)是一类在天冬氨酸残基处裂解蛋白质的蛋白酶家族,在细胞凋亡过程中起调节作用^[67]。Randall等^[68]在微流控芯片上实现了同时捕获并诱导淋巴细胞凋亡,他们将抗CD-95的抗体粘附在玻璃基底上,连有脂肪酸合成酶(Fas)受体的细胞流经微流控芯片通道时被捕获,与此同时经由caspases-8途径诱导淋巴细胞凋亡,被固定在通道表面的细胞被认为经历细胞凋亡过程。Dai等^[69]设计了浓度梯度的芯片检测细胞凋亡程度,将青色和黄色荧光蛋白用含有caspase-3裂解位点的短肽连接,通过质粒转染HeLa-C3细胞,然后用不同浓度的依托泊苷(一种治疗肿瘤的药物)处理细胞,凋亡的细胞激活caspase-3,在荧光显微镜下观察到绿色荧光,而未凋亡细胞可观察到蓝色荧光。除此之外,细胞凋亡时细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸外翻,钙磷脂结合蛋白V (Annexin V)与磷脂酰丝氨酸有高度的亲和



A: 左图为单个HeLa细胞通过微缺口的迁移研究, 这个装置包括3个平行的通道和两排宽度为 $3\ \mu\text{m}$ 和 $10\ \mu\text{m}$ 的微缺口, 右图箭头指示细胞核的位置, HeLa细胞从底部通道向中间通道迁移; B: 汇合细胞创造边缘伤口过程, 首先从三个入口灌入细胞, 两天后当细胞汇合到一起时, 分别灌注30 mL PBS、胰蛋白酶和EDTA混合液, 然后再加入表皮生长因子、细胞松弛素D和鬼臼环肽; C: 用于研究细胞迁移的开放性微流控装置。1: 从底部观察到的芯片示意图。PDMS层包括细胞存储池和微通道, 含有cAMP和叶酸混合液的微滴管放在微通道的前方; 2: 装置侧面观, 细胞从储液池灌入, 在玻璃层表面向微滴管方向移动; 3: 窄通道区域内细胞迁移示意图。区域内总共有16个通道, 宽度分别为6, 8, 10, $12\ \mu\text{m}$, 每隔宽度重复4次; 4: 两个宽通道区域内细胞迁移示意图, 每个通道宽度为 $100\ \mu\text{m}$ 。(参照参考文献[72-74]修改)

A: the migration study of individual HeLa cells across microgaps (left). A typical device contains 3 parallel channels and 2 rows of microgaps of either 3 or $10\ \mu\text{m}$ in width. Arrows indicate the position of the cell nucleus (right). The direction of HeLa cell migration is from the bottom channel to the middle channel; B: patterning processes to create wound edges for the confluent cells. First cells were loaded from the three inlets, after two days, when the cells reached confluence, 30 mL of PBS and trypsin/EDTA (TE) solution were, respectively, injected from the three inlets. EGF, CD, or phalloidin were then added to the medium; C: the open microfluidic device (OMD) for studying cell migration. 1: schematic diagram of an open microfluidic device viewed from the bottom. The PDMS layer contains cell port and channels. A micropipette filled with the mixture of cAMP and folic acid is placed in front of the narrow channel region; 2: a side view of the device. Cells are loaded through the cell port and crawling on the glass surface toward the micropipette; 3: scheme of the narrow channel region with cells crawling toward the micropipette. In the actual device, there are 16 channels with each size represented 4 times. The channel widths are 6, 8, 10, $12\ \mu\text{m}$; 4: scheme of two wide channel regions with cells crawling toward the micropipette. The width of each wide channel is $100\ \mu\text{m}$. (modified from reference [72-74])

图5 微流控芯片细胞迁移研究

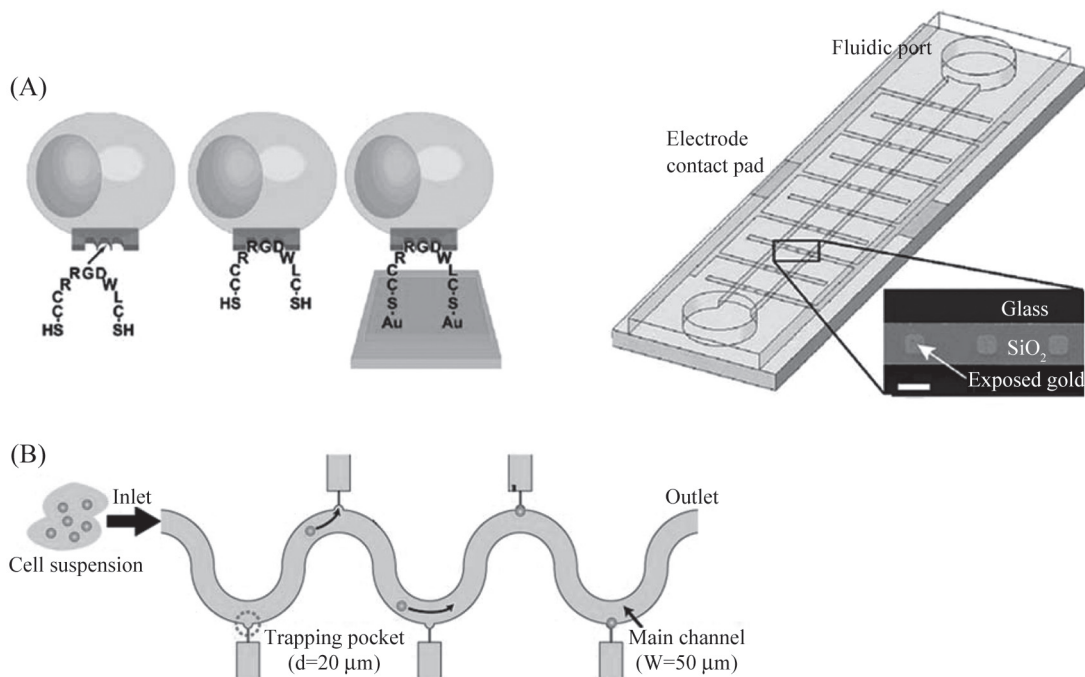
Fig.5 The study of on-chip cell migration

力, 利用这一特性, Zhao等^[70]以Annexin V功能化的量子点为探针, 在微流控芯片上检测经抗癌药物作用后白血病HL-60细胞的凋亡程度, 荧光强度反映了细胞凋亡的程度, 在单细胞水平上成功区分了凋亡和非凋亡细胞。

2.6 细胞迁移

细胞迁移也称细胞运动, 指的是细胞在接收到迁移信号或感受到某些物质的浓度梯度后产生的移动。细胞觅食、损伤的痊愈、胚胎发生、免疫、感染和癌症转移等生理现象都涉及到细胞的迁移, 因此细胞迁移是目前细胞生物学研究的一个重要内容。目前, 最常用的研究细胞迁移的方法之一是划痕法, Liang等^[71]设计了一种填充芯片来研究细胞的迁移, 芯片由两层管道组成, 下层用来培养细胞, 上层管道用来控制液体流动及产生伤痕区域, 每隔一

段时间拍摄图像并计算出没有被细胞填充的区域, 借此衡量细胞的迁移速度。Chaw等^[72]设计了如图4A所示的芯片来研究细胞的迁移, 芯片共有三个平行的通道, 中间通道与另两个通道间分别有多个宽 $3\ \mu\text{m}$ 和 $10\ \mu\text{m}$ 的缺口, 其中上下两个通道灌入细胞和基本培养基, 而中间通道灌入基本培养基和10%的胎牛血清, 在趋化因子的作用下, 上下两层通道中的细胞会按箭头指示方向运动。Nie等^[72-73]用胰蛋白酶消化产生划痕, 观察细胞在表皮生长因子等作用下的迁移情况, 实验过程如图4B所示, 首先在三个平行的宽 $300\ \mu\text{m}$ 通道灌注胚胎纤维细胞(NIH 3T3), 待细胞贴壁生长后用胰蛋白酶和EDTA混合液(TE)消化, 然后加入基本培养基(DMEM)、表皮生长因子(EGF)、细胞松弛素D (CD)、鬼比环肽(phalloidin), 观察细胞迁移运动。Jowhar等^[74]还设计了不同宽度的通道来



A: 左图为精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸肽介导的细胞硫醇化过程。两端均含有巯基的九肽与CHO细胞表面结合, 然后巯基官能团与金电极表面结合, 捕获细胞。右图为整体单细胞捕获芯片示意图, 当电场强度为 $50\ \text{V}/\text{cm}$ 时, 细胞被捕获在相应的交错电极; B: 用于细胞捕获的蛇形通道结构示意图。细胞悬液从进口注入, 单个细胞相继被捕获在捕获口袋, 主通道宽 $50\ \mu\text{m}$, 捕获口袋直径 $20\ \mu\text{m}$ 。(参照参考文献[78-79]修改)

A: illustration of RGD mediated cell thiolation process (left). Integrin proteins (CARRGDWLC) containing cysteine residues at both termini are combined with the CHO cell surface, then the thiol functional groups on the peptide bind to exposed gold pads and hold the cell in place. Schematic of the glass PDMS microdevice for single-cell capture (right). Cells are directed to the desired electrode by applying a $50\ \text{V}/\text{cm}$ electric field between the interdigitated electrodes; B: diagrammatic sketch of the structures of the serpentine microchannel for cell capture. Cell suspension are injected from the inlet, then a single cell was individually trapped in each trapping pocket. The main channel's width is $50\ \mu\text{m}$, while the half circular trapping pocket's diameter is $20\ \mu\text{m}$. (modified from reference [78-79])

图6 单细胞捕获示意图

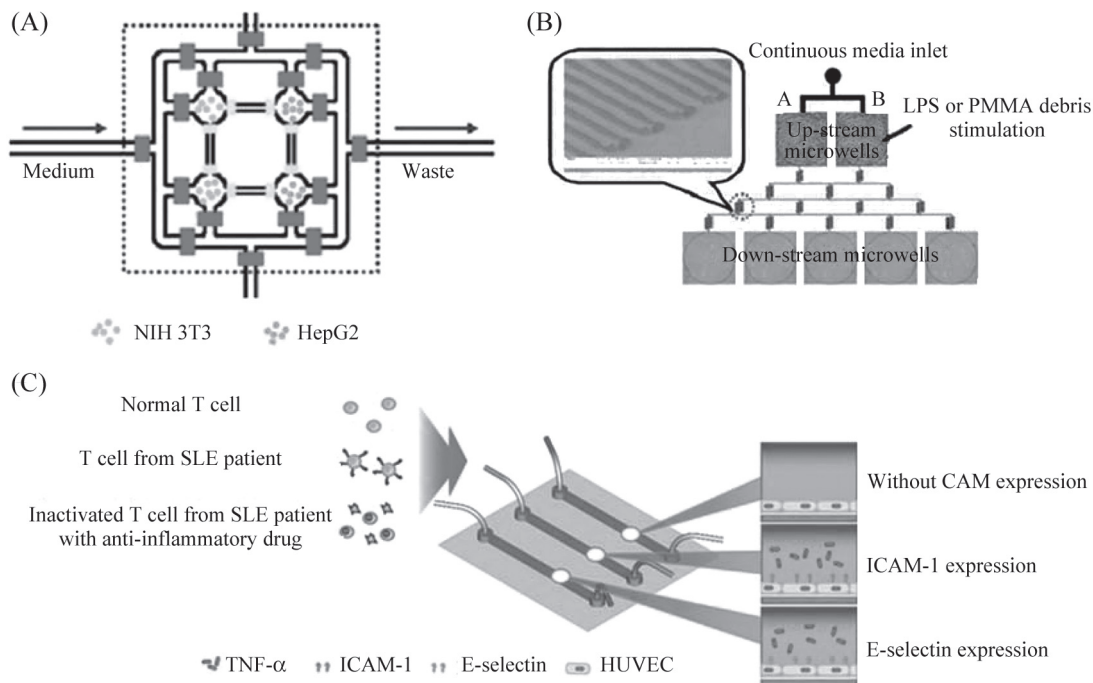
Fig. 6 The schematic view of single-cell capture

观察盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)的迁移活动,通常情况下盘基网柄菌以单细胞形式存在,当食物匮乏时分泌环腺苷酸(cAMP)并在cAMP作用下聚集成多细胞,如图所示,将饥饿处理的极性细胞和未处理的非极性细胞分别用荧光标记,混合后引入到细胞储液池,在通道另一侧用微滴灌注注入cAMP和叶酸混合液,观察两种细胞的迁移速率和迁移路径。

2.7 单细胞捕获

在传统的对细胞增殖、分化及细胞对外界刺激反应的研究中,通常把细胞样品看成是均一稳定的,而事实上细胞通常是异质性的,所以单细胞分析在理解细胞个体间的差异显得尤为重要^[75]。在单细胞水平进行研究相对于传统的细胞生物技术及分析方法更具优势,因为其能更精确、直接地观察到细胞、亚细胞水平的动态和不连续过程^[76],使蛋白质

定位及动力学的研究成为可能^[77],同时可以检测单个细胞对相同的信号分子的不同反应。单细胞水平研究的前提是实现单细胞捕获,进而才能对其内含物进行分析或实现单细胞操控。目前,已经有很多成功应用的实例,比如Nicholas等^[78]设计了电场驱动单细胞捕获的装置,如图5A所示,中国仓鼠卵巢细胞(CHO cells)用合成的含有巯基的九肽(CCRRGD-WLC)进行标记,然后将细胞悬浮液引入到微通道中,被标记的细胞与金电极表面结合形成金硫键,从而达到细胞捕获的效果。Takahiro等^[79]设计了捕获口袋来实现单细胞捕获,如图5B所示,蛇形通道两侧有直径20 μm的捕获口袋,当细胞悬浮液流经通道主通道时,会有部分细胞被捕获,进而进行荧光标记、细胞裂解及内含物的检测。就目前看来,微流控芯片上进行单细胞操作有着非常好的应用前景,



A: NIH 3T3与HepG2共培养示意图,上下两个通道用于灌注细胞,左边通道用于培养基的注入,右侧通道用于代谢废物的流出; B: 巨噬细胞和成骨细胞共培养示意图,巨噬细胞位于上游培养区,成骨细胞位于下游培养区; C: T细胞与内皮细胞相互作用研究示意图,首先将HUVECs灌注到芯片上,并用肿瘤坏死因子(TNF- α)刺激诱导表面分子表达,T细胞用异硫氰酸荧光素(FITC)连接的CD3抗体标记,在荧光显微镜下观察T细胞,SLE: 系统性红斑狼疮。(参照参考文献[83-85]修改)

A: scheme of the microfluidic system for co-culture of NIH 3T3 and HepG2, cells were loaded from the top and bottom channels, while the medium was loaded from the left channel and the waste outflowed from the right channel; B: schematic representation of the microfluidic coculture system. The macrophages were cultured in up-stream microwells and osteoblasts were cultured in down-stream microwells; C: scheme of the study on the interaction of T cell and endothelium HUVECs were loaded into the device and stimulated with TNF- α to induce surface molecule expression. T cell was observed under fluorescence microscopy after incubation with FITC-conjugated CD3 antibodies, SLE: systemic lupus erythematosus. (modified from reference [83-85])

图7 细胞间相互作用研究示意图

Fig.7 The schematic view of study on cell interaction

比如对神经细胞之间递质的传递,体外受精以及细胞之间相互作用的研究等。

2.8 细胞间相互作用

细胞间相互作用是指细胞间的直接作用,在多细胞生物的发育及功能发挥中起着重要作用,并且在衰老及病理条件下可以维持体内的稳态。细胞间相互作用参与许多生理及病理过程,例如胚胎发育、伤口愈合、肿瘤侵袭和转移等^[80-81]。微流控芯片具有设计灵活的特点,在大量的微通道中可同时培养多种细胞,通过对3D胞外基质的引入可实时监测和控制生化因子和信号分子的产生及其浓度,更适合细胞间相互作用的研究^[82]。目前微流控芯片研究细胞间相互作用最常用的方法是细胞共培养。Liu等^[83]用芯片实现胚胎成纤维细胞(NIH 3T3)和肝癌细胞(HepG2)的共培养,如图7A所示,两种细胞分别用不同的荧光分子标记,打开通道阀门,给予充足的营养,在荧光显微镜下可观察到NIH 3T3向HepG2方向移动。Wei等^[84]设计了一种能更精确反映细胞间相互作用的微流控细胞共培养体系,如图7B所示,体系包括上游和下游细胞培养区,上游细胞培养区用来培养巨噬细胞,当用脂多糖(LPS)或聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)给予刺激时,巨噬细胞分泌白细胞介素-1 β 和肿瘤坏死因子- α ,这两种代谢产物通过微通道网络结构形成浓度梯度,作用于下游的成骨细胞,促进成骨细胞分泌前列腺素E2。白细胞与内皮细胞的相互作用对白细胞在免疫系统中的迁移及功能发挥着重要作用,而这两种细胞的相互作用需要细胞粘附分子(CAM)的参与,为了研究这两种细胞间的作用, Park等^[85]设计如图7C所示芯片,通过CAM的表达量来研究T淋巴细胞(白细胞的一种)与人脐静脉内皮细胞(HUVECs)之间的相互作用。

3 展望

微流控芯片技术自20世纪90年代出现以后,随着生物、材料、化学、物理工程和电子工程等学科的介入,目前已取得了巨大的发展,其最终目的是建立多功能芯片实验室。微流控芯片技术正以其独特的优势越来越多地应用到细胞生物学研究中,其不仅可以为细胞提供可控制的生存微环境,与其他分析方法结合检测细胞内生化过程^[86],而且在细胞个体、细胞群体和多细胞生命体三个层次对细胞的生命活动进行深入研究^[87]。另一方面,微流控芯片仍

处于发展初期,许多方面的技术还不成熟,如不能进行长期细胞培养^[88];细胞三维培养中一些水凝胶和粘连蛋白的引入可能阻塞通道和妨碍物质传输;电裂解细胞时产生的焦耳热和气泡会影响细胞生长和代谢等。目前微流控芯片大多处于实验室概念化论证阶段,尚未达到理想的商业化和通用化程度;对微流控芯片技术了解不多的生物研究人员,应用起来还有一定的困难^[89]。但是,基于微流控芯片的突出优点和人们对新技术的需求,我们相信微流控芯片细胞实验室将成为细胞生物学研究的重要平台。

参考文献 (References)

- 1 林炳承,秦建华.微流控芯片实验室.色谱 2005; 23(5): 456-63.
- 2 Zhao S, Li X, Liu YM. Integrated microfluidic system with chemiluminescence detection for single cell analysis after intracellular labeling. Anal Chem 2009; 81(10): 3873-8.
- 3 Huang Y, Mather EL, Bell JL, Madou M. MEMS-based sample preparation for molecular diagnostics. Anal Bioanal Chem 2002; 372(1): 49-65.
- 4 Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. J Biosci Bioeng 2005; 100(1): 1-11.
- 5 Breslauer DN, Lee PJ, Lee LP. Microfluidics-based systems biology. Mol BioSyst 2006; 2(2): 97-112.
- 6 Yeon JH, Park JK. Microfluidic cell culture systems for cellular analysis. Biochip J 2007; 1(1): 17-27.
- 7 Chung BG, Park JW, Hu JS, Huang C, Monuki ES, Jeon NL. A hybrid microfluidic-vacuum device for direct interfacing with conventional cell culture methods. BMC Biotechnol 2007; 7: 60.
- 8 Kim MS, Yeon JH, Park JK. A microfluidic platform for 3-dimensional cell culture and cell-based assays. Biomed Microdevices 2007; 9(1): 25-34.
- 9 Abbott A. Cell culture: Biology's new dimension. Nature 2003; 424(6951): 870-2.
- 10 Golden AP, Tien J. Fabrication of microfluidic hydrogels using molded gelatin as a sacrificial element. Lab Chip 2007; 7(6): 720-5.
- 11 Ng CP, Pun SH. A perfusable 3D cell matrix tissue culture chamber for *in situ* evaluation of nanoparticle vehicle penetration and transport. Biotechnol Bioeng 2008; 99(6): 1490-501.
- 12 Ong SM, Zhang C, Toh YC, Kim SH, Foo HL, Tan CH, et al. A gel-free 3D microfluidic cell culture system. Biomaterials 2008; 29(22): 3237-44.
- 13 Huang CW, Lee GB. A microfluidic system for automatic cell culture. J Micromech Microeng 2007; 17(7): 1266.
- 14 Nevill JT, Cooper R, Dueck M, Breslauer DN, Lee LP. Integrated microfluidic cell culture and lysis on a chip. Lab Chip 2007; 7(12): 1689-95.
- 15 Baudoin R, Corlu A, Griscom L, Legallais C, Leclerc E. Trends

- in the development of microfluidic cell biochips for *in vitro* hepatotoxicity. *Toxicol In Vitro* 2007; 21(4): 535-44.
- 16 Gupta K, Kim DH, Ellison D, Smith C, Kundu A, Tuan J, *et al.* Lab-on-a-chip devices as an emerging platform for stem cell biology. *Lab Chip* 2010; 10(16): 2019-31.
- 17 Park JY, Takayama S, Lee SH. Regulating microenvironmental stimuli for stem cells and cancer cells using microsystems. *Integr Biol (Camb)* 2010; 2(5/6): 229-40.
- 18 Huh D, Gu W, Kamotani Y, Grotberg JB, Takayama S. Microfluidics for flow cytometric analysis of cells and particles. *Physiol Meas* 2005; 26(3): R73-98.
- 19 Yang SY, Hsiung SK, Hung YC, Chang CM, Liao TL, Lee GB. A cell counting/sorting system incorporated with a microfabricated flow cytometer chip. *Meas Sci Technol* 2006; 17(7): 2001-9.
- 20 Lin CH, Lee GB. Micromachined flow cytometers with embedded etched optic fibers for optical detection. *J Micromech Microeng* 2003; 13(3): 447-53.
- 21 Tsutsui H, Ho CM. Cell separation by non-inertial force fields in microfluidic systems. *Mech Res Commun* 2009; 36(1): 92-103.
- 22 Chen X, Cui DF, Liu CC, Li H. Microfluidic chip for blood cell separation and collection based on crossflow filtration. *Sens Actuators B Chem* 2008; 130(1): 216-21.
- 23 Li JM, Liu C, Dai XD, Chen HH, Liang Y, Sun HL, *et al.* PMMA microfluidic devices with three-dimensional features for blood cell filtration. *J Micromech Microeng* 2008; 18(9): 95021.
- 24 Chen X, Cui D, Liu C, Li H, Chen J. Continuous flow microfluidic device for cell separation, cell lysis and DNA purification. *Anal Chim Acta* 2007; 584(2): 237-43.
- 25 Nieuwenhuis JH, Vellekoop MJ. Simulation study of dielectrophoretic particle sorters. *Sensors Actuators B* 2004; 103(1/2): 331-8.
- 26 Khoshmanesh K, Nahavandi S, Baratchi S, Mitchell A, Kalantarzadeh K. Dielectrophoretic platforms for bio-microfluidic systems. *Biosens Bioelectron* 2011; 26(5): 1800-14.
- 27 Chung YC, Jan MS, Lin YC, Lin JH, Cheng WC, Fan CY. Microfluidic chip for high efficiency DNA extraction. *Lab Chip* 2004; 4(2): 141-7.
- 28 Riviere C, Boudghene FP, Gazeau F, Roger J, Pons JN, Laissy JP, *et al.* Iron oxide nanoparticle-labeled rat smooth muscle cells: Cardiac MR imaging for cell graft monitoring and quantitation. *Radiology* 2005; 235(3): 959.
- 29 Yang F, Yang X, Jiang H, Bulkhauls P, Wood P, Hrushesky W, *et al.* Dielectrophoretic separation of colorectal cancer cells. *Biomicrofluidics* 2010; 4(1): 13204.
- 30 Church C, Zhu J, Nieto J, Keten G, Ibarra E, Xuan X. Continuous particle separation in a serpentine microchannel via negative and positive dielectrophoretic focusing. *J Micromech Microeng* 2010; 20: 65011.
- 31 Nascimento EM, Nogueira N, Silva T, Braschler T, Demierre N, Renaud P, *et al.* Dielectrophoretic sorting on a microfabricated flow cytometer: Label free separation of *Babesia bovis* infected erythrocytes. *Bioelectrochemistry* 2008; 73(2): 123-8.
- 32 Jen CP, Huang CT, Weng CH. Focusing of biological cells utilizing negative dielectrophoretic force generated by insulating structures. *Microelectron Eng* 2010; 87(5/6/7/8): 773-7.
- 33 Pommer MS, Zhang Y, Keerthi N, Chen D, Thomson JA, Meinhart CD, *et al.* Dielectrophoretic separation of platelets from diluted whole blood in microfluidic channels. *Electrophoresis* 2008; 29(6): 1213-8.
- 34 Studer V, Jameson R, Pellereau E, Pepin A, Chen Y. A microfluidic mammalian cell sorter based on fluorescence detection. *Microelectronic Engineering* 2004; 73/74: 852-7.
- 35 Wang MM, Tu E, Raymond DE, Yang JM, Zhang H, Hagen N, *et al.* Microfluidic sorting of mammalian cells by optical force switching. *Nat Biotechnol* 2005; 23(1): 83-7.
- 36 Lin CC, Chen A, Lin CH. Microfluidic cell counter/sorter utilizing multiple particle tracing technique and optically switching approach. *Biomed Microdevices* 2008; 10(1): 55-63.
- 37 Gijs M. Magnetic bead handling on-chip: New opportunities for analytical applications. *Microfluid Nanofluidics* 2004; 1(1): 22-40.
- 38 Saliba A, Saiaes L, Psychari E, Minc N, Simon D, Bidard F, *et al.* Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(33): 14524-9.
- 39 Rong R, Choi JW, Ahn CH. An on-chip magnetic bead separator for biocell sorting. *J Micromech Microeng* 2006; 16(12): 2783-90.
- 40 Pamme N, Wilhelm C. Continuous sorting of magnetic cells via on-chip free-flow magnetophoresis. *Lab Chip* 2006; 6(8): 974-80.
- 41 Adams JD, Soh HT. Perspectives on utilizing unique features of microfluidics technology for particle and cell sorting. *JALA Charlottesv Va* 2009; 14(6): 331-40.
- 42 Adams JD, Kim U, Soh HT. Multitarget magnetic activated cell sorter. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(47): 18165-70.
- 43 Wang HY, Bhunia AK, Lu C. A microfluidic flow-through device for high throughput electrical lysis of bacterial cells based on continuous dc voltage. *Biosens Bioelectron* 2006; 22(5): 582-8.
- 44 Kido H, Micic M, Smith D, Zoval J, Norton J, Madou M. A novel, compact disk-like centrifugal microfluidics system for cell lysis and sample homogenization. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007; 58(1): 44-51.
- 45 Ocvirk G, Salimi-Moosavi H, Szarka R, Arriaga E, Andersson P, Smith R, *et al.* β -galactosidase assays of single-cell lysates on a microchip: A complementary method for enzymatic analysis of single cells. *Proc IEEE Inst Electr Electron Eng* 2005; 92(1): 115-25.
- 46 Lu H, Schmidt MA, Jensen KF. A microfluidic electroporation device for cell lysis. *Lab Chip* 2005; 5(1): 23-9.
- 47 Lee D, Cho Y. A continuous electrical cell lysis device using a low dc voltage for a cell transport and rupture. *Sens Actuators B*

- Chem 2007; 124(1): 84-9.
- 48 Lu KY, Wo AM, Lo YJ, Chen KC, Lin CM, Yang CR. Three dimensional electrode array for cell lysis via electroporation. *Biosens Bioelectron* 2006; 22(4): 568-74.
- 49 McClain MA, Culbertson CT, Jacobson SC, Allbritton NL, Sims CE, Ramsey JM. Microfluidic devices for the high-throughput chemical analysis of cells. *Anal Chem* 2003; 75(21): 5646-55.
- 50 Baek SK, Min J, Park JH. Wireless induction heating in a microfluidic device for cell lysis. *Lab Chip* 2010; 10(7): 909-17.
- 51 Piacentini N, Demarchi D, Civera P, Knaflitz M. Blood cell counting by means of impedance measurements in a microsystem device. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2008; 2008: 4824-7.
- 52 Lin YH, Lee GB. Optically induced flow cytometry for continuous microparticle counting and sorting. *Biosens Bioelectron* 2008; 24(4): 572-8.
- 53 Lee GB, Lin CH, Chang SC. Micromachine-based multi-channel flow cytometers for cell/particle counting and sorting. *J Micro-mech Microeng* 2005; 15(3): 447-54.
- 54 Satake D, Ebi H, Oku N, Matsuda K, Takao H, Ashiki M, *et al.* A sensor for blood cell counter using MEMS technology. *Sens Actuators B Chem* 2002; 83(1/2/3): 77-81.
- 55 Lin YH, Lee GB. An integrated cell counting and continuous cell lysis device using an optically induced electric field. *Sens Actuators B Chem* 2010; 145(2): 854-60.
- 56 Cheng X, Gupta A, Chen C, Tompkins RG, Rodriguez W, Toner M. Enhancing the performance of a point-of-care CD4+ T-cell counting microchip through monocyte depletion for HIV/AIDS diagnostics. *Lab Chip* 2009; 9(10): 1357-64.
- 57 Cheng X, Irimia D, Dixon M, Sekine K, Demirci U, Zamir L, *et al.* A microfluidic device for practical label-free CD4+ T cell counting of HIV-infected subjects. *Lab Chip* 2007; 7(2): 170-8.
- 58 Imaad SM, Lord N, Kulsharova G, Liu GL. Microparticle and cell counting with digital microfluidic compact disc using standard CD drive. *Lab Chip* 2011; 11(8): 1448-56.
- 59 Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4): 239-57.
- 60 Grimsley C, Ravichandran KS. Cues for apoptotic cell engulfment: Eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends Cell Biol* 2003; 13(12): 648-56.
- 61 Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. Apoptosis in human disease: A new skin for the old ceremony. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 266(3): 699-717.
- 62 Martinez MM, Reif RD, Pappas D. Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Anal Methods* 2010; 2(8): 996-1004.
- 63 Bouchier-Hayes L, Munoz-Pinedo C, Connell S, Green DR. Measuring apoptosis at the single cell level. *Methods* 2008; 44(3): 222-8.
- 64 Reif RD, Aguas C, Martinez MM, Pappas D. Temporal dynamics of receptor-induced apoptosis in an affinity microdevice. *Anal Bioanal Chem* 2010; 397(8): 3387-96.
- 65 Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391(6662): 43-50.
- 66 Klepárník K, Horký M. Detection of DNA fragmentation in a single apoptotic cardiomyocyte by electrophoresis on a microfluidic device. *Electrophoresis* 2003; 24(21): 3778-83.
- 67 Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 2004; 384(Pt 2): 201-32.
- 68 Reif RD, Martinez MM, Wang K, Pappas D. Simultaneous cell capture and induction of apoptosis using an anti-CD95 affinity microdevice. *Anal Bioanal Chem* 2009; 395(3): 787-95.
- 69 Dai W, Zheng Y, Luo KQ, Wu H. A prototypic microfluidic platform generating stepwise concentration gradients for real-time study of cell apoptosis. *Biomicrofluidics* 2010; 4(2): 24101.
- 70 Zhao L, Cheng P, Li J, Zhang Y, Gu M, Liu J, *et al.* Analysis of nonadherent apoptotic cells by a quantum dots probe in a microfluidic device for drug screening. *Anal Chem* 2009; 81(16): 7075-80.
- 71 Liang CC, Park AY, Guan JL. *In vitro* scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nat Protoc* 2007; 2(2): 329-33.
- 72 Chaw KC, Manimaran M, Tay FE, Swaminathan S. A quantitative observation and imaging of single tumor cell migration and deformation using a multi-gap microfluidic device representing the blood vessel. *Microvasc Res* 2006; 72(3): 153-60.
- 73 Nie FQ, Yamada M, Kobayashi J, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. On-chip cell migration assay using microfluidic channels. *Biomaterials* 2007; 28(27): 4017-22.
- 74 Jowhar D, Wright G, Samson PC, Wikswo JP, Janetopoulos C. Open access microfluidic device for the study of cell migration during chemotaxis. *Integr Biol (Camb)* 2010; 2(11/12): 648-58.
- 75 Chung J, Kim YJ, Yoon E. Highly-efficient single-cell capture in microfluidic array chips using differential hydrodynamic guiding structures. *Appl Phys Lett* 2011; 98: 123701.
- 76 Ainla A, Jansson ET, Stepanyants N, Orwar O, Jesorka A. A microfluidic pipette for single-cell pharmacology. *Anal Chem* 2010; 82(11): 4529-36.
- 77 Eriksson E, Sott K, Lundqvist F, Sveningsson M, Scrimgeour J, Hanstorp D, *et al.* A microfluidic device for reversible environmental changes around single cells using optical tweezers for cell selection and positioning. *Lab Chip* 2009; 10(5): 617-25.
- 78 Toriello NM, Douglas ES, Mathies RA. Microfluidic device for electric field-driven single-cell capture and activation. *Anal Chem* 2005; 77(21): 6935-41.
- 79 Arakawa T, Noguchi M, Sumitomo K, Yamaguchi Y, Shoji S. High-throughput single-cell manipulation system for a large number of target cells. *Biomicrofluidics* 2011; 5(1): 014114.
- 80 Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in

- cancer initiation and progression. *Nature* 2004; 432(7015): 332-7.
- 81 Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008; 453(7193): 314-21.
- 82 Zervantonakis IK, Kothapalli CR, Chung S, Sudo R, Kamm RD. Microfluidic devices for studying heterotypic cell-cell interactions and tissue specimen cultures under controlled microenvironments. *Biomicrofluidics* 2011; 5(1): 13406.
- 83 Liu W, Li L, Wang X, Ren L, Wang J, Tu Q, *et al.* An integrated microfluidic system for studying cell-microenvironmental interactions versatily and dynamically. *Lab Chip* 2010; 10(13): 1717-24.
- 84 Wei CW, Cheng JY, Young TH. Elucidating *in vitro* cell-cell interaction using a microfluidic coculture system. *Biomed Microdevices* 2006; 8(1): 65-71.
- 85 Park JY, Kim HO, Kim KD, Kim SK, Lee SK, Jung H. Monitoring the status of T-cell activation in a microfluidic system. *Analyst* 2011; 136(13): 2831-6.
- 86 El-Ali J, Sorger PK, Jensen KF. Cells on chips. *Nature* 2006; 442(7101): 403-11.
- 87 秦建华, 刘婷姣, 林炳承. 微流控芯片细胞实验室. *色谱* 2009; 27(5): 655-61.
- 88 Wang Z, Kim MC, Marquez M, Thorsen T. High-density microfluidic arrays for cell cytotoxicity analysis. *Lab Chip* 2007; 7(6): 740-5.
- 89 Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. *Nature* 2006; 442(7101): 368-73.

Recent Applications of Microfluidic Technology in the Field of Cell Biology

Yao Lin, Bai Liang, Wu Liangqi, Ding Yongsheng*

(College of Life Sciences, Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Since the early 1990s, microfluidics, also called “lab on a chip” is growing rapidly. Because of having the characteristics of miniaturization, integration, high throughput, low energy consumption and rapid analysis, microfluidics becomes attractive in cell biological research as a promising platform. Microfluidic technology enables us to investigate cell behavior with precise and localized of experimental conditions which are unreachable by using macroscopic tools. This review mainly summarizes recent applications of microfluidics in cell culture, cell sorting, cell lysis, cell counting, cell apoptosis, cell migration, cell capturing and cell interaction.

Key words microfluidics; cell culture; cell sorting; cell lysis; cell count; cell apoptosis; cell migration; cell capturing; cell interaction

Received: May 9, 2011 Accepted: July 12, 2011

This work was supported by the Basic and Frontier Research Project of Chinese Academy of Sciences (No.KSCX2-EW-J-29)

*Corresponding author. Tel: 86-10-88256392, Fax: 86-10-88256079, E-mail: dingysh@gucas.ac.cn