文章编号:1009-0002(2008)01-0076-04

研究报告

基于玻璃基底的细胞培养芯片研究

杨才表 a,b,陈强 a,b,邵建波 a,b,吴蕾 a,赵建龙 b

中国科学院 a. 上海微系统与信息技术研究所,上海 200050; b. 研究生院,北京 100039

[摘要] 目的: 为了对细胞进行长期观察和培养, 研究细胞培养芯片的制作以及其与温度控制装置、进样系统、信号检测系统等的整合。方法: 以商品化的氧化铟锡(ITO)透明导电玻璃为芯片加工的基质材料, 利用光刻胶 AZ4620 作为玻璃湿法刻蚀的掩模层, 并应用玻璃湿法刻蚀过程中的钻蚀效应, 快速、低成本地加工细胞培养芯片; 将此芯片与聚二甲基硅氧烷(PDMS) 薄膜经氧等离子体作用后共价结合, 整合温度控制系统、进样系统、信号检测系统等。结果: 获得了可用于细胞培养的微系统, 实现了对猪髂骨动脉内皮细胞(PIEC) 在芯片内至少 3 d 的观察和培养。结论: 制备的芯片能够用于细胞的长期观察和培养, 为研究细胞迁移特性等提供了有效工具。

[关键词] 氧化铟锡玻璃;湿法刻蚀;钻蚀效应;细胞培养

[中图分类号] TN364; Q813.1

[文献标识码] A

Study on Glass Cell Culture Chips

YANG Cai-Biao^{ab}, CHEN Qiang^{ab}, SHAO Jian-Bo^{ab}, WU Lei^a, ZHAO Jian-Long^b a Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Shanghai 200050; b. Graduate School, Beijing 100039; Chinese Academy of Sciences, China

[Abstract] Objective: In order to observe and culture cell in vitro in a long period, the fabrication procedures about cell culture chips on glass and its integration with temperature control system, perfusion system and signal detection system were studied. Methods: Commercially-available indium-tin-oxide(ITO) glass and a layer of AZ4620 positive photoresist were used to be substrate materials and etch mask separately. Underetch phenomenon in glass wet etch also played an important role to etch microchannels. The glass substrate was then covalently bonded with PDMS film after oxygen plasma process to form the cell culture chips. Besides the cell culture chips, it was necessary to integrate temperature control system, perfusion system and signal detection system in the cell culture microsystem. Results: Porcine iliac artery endothelial cell(PIEC) were cultured successfully within the cell culture system more than three days. Conclusion: The results showed that the cell culture chip could be used to observe and culture cells in vitro in a long period, which supplied a good tool for investigating the cell migration in vitro.

[Key words] indium-tin-oxide glass; wet etch; underetch; cell culture

近几年来,微全分析系统(micro total analysis system, µTAS)技术日益受到人们关注,广泛应用于生化分析和细胞学研究领域^[1-2]。µTAS技术应用于细胞学研究的一个重要发展方向是开发细胞培养微系统,用于细胞迁移^[3-4]、细胞分化^[6]、药物筛选^[6]等。与常规细胞体外培养技术相比,利用细胞培养微系统培养细胞能够较好地模拟细胞体内生长的微环境。然而,在设计细胞培养芯片时,必须考虑芯片材料的生物兼容性、培养液流动导致的机械力对细胞的影响和有效成分的传递输送等因素^[7]。其中,如何通过简单快速的微细加工工艺加工生物兼容性良好的材料,是需要解决的首要问题。

目前用于加工细胞培养芯片的材料主要有硅、玻璃和聚二甲基硅氧烷(PDMS)等聚合物材料。PDMS芯片通常采用复制压模技术制作^图,能够实现微米级图案的高保真复制,并且具有良好的生物兼容性,可直接培养各类细胞。但 PDMS是弹性材料,易受有机试剂作用产生微通道变形、溶胀等现象;且 PDMS管道表面为疏水性,很难润湿亲水性溶液,在培养液进样过程中容易

产生气泡而损伤细胞^[9]。

与 PDMS 材料相比, 玻璃材质芯片具有良好的亲水性能、力学性能, 且制作设备与传统集成电路(IC) 工艺设备相兼容。但目前制作玻璃芯片,是在玻璃基底上溅射一层金属或多晶硅等薄膜材料作为刻蚀掩模层, 然后进行湿法或干法刻蚀, 最后在超净环境中利用高电压或高温进行键合^[10], 整个加工工艺复杂, 价格昂贵。

为了综合利用玻璃材料和 PDMS材料的优点,我们提出了一种基于玻璃湿法腐蚀过程中的钻蚀(underetch)效应^[11],廉价、快速地制作玻璃细胞培养芯片的方法。以商品化的氧化铟锡(indium-tin-oxide, ITO)透明导电玻璃为芯片基质,以一层

[收稿日期] 2007-04-30

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划项目(2005CB724305); 上海市科委纳米专项(0652nm016,06JC14081)

[作者简介] 杨才表(1981-),男,硕士研究生, (E-mail)daofei@mail.sim.ac.cn AZ4620 光刻胶作为玻璃刻蚀的掩模层,以 BOE(buffered oxide etch) 液为玻璃腐蚀液,通过上胶、曝光、显影、腐蚀、去胶、键合等步骤获得细胞培养芯片。其中,盖片仍采用 PDMS 材料,以利用它的透气性特质。采用 ITO 玻璃有利于集成加热系统,满足细胞长期观察和记录细胞活动的需要。最后,将该芯片与温度控制系统、视频观察系统等整合,培养猪髂骨动脉内皮细胞(porcine illiac artery endothelial cell, PIEC),证实了该方法的可行性和系统的稳定性。

1 材料和方法

1.1 材料

细胞培养芯片的基质材料为商品化的 ITO 玻璃(CONDUCTN, 江苏康达克应用薄膜中心); 刻蚀掩模层采用正性光刻胶 AZ4620 (AZ photoresist products, 美国); PDMS 单体为 Sylgard 184(Dow Corning, 美国); 细胞培养芯片加工过程中所用化学试剂均为分析纯产品, 玻璃腐蚀液为 BOE 液。

1.2 微流控芯片的加丁

以 ITO 玻璃为基质材料的细胞培养芯片制作主要包括掩膜板制作、ITO 玻璃清洗、曝光、刻蚀、键合等步骤, 见图 1。

1.2.1 掩模板制作 芯片掩模板如图 2 所示。进样孔 1、3 之间距离为 14 mm, 用于导入细胞, 管道狭窄处宽度为 200 μm, 其他为细胞培养区域, 宽度为 800 μm; 2、4 间管道为培养液导入通道, 宽 150 μm, 总长 14 mm。培养液通道和细胞培养区域之间距离为 190 μm, 用于加工后续的"坝型"结构。

1.2.2 ITO玻璃清洗 将 ITO玻璃先用丙酮和酒精超声清洗, 再用去离子水冲洗干净, 放入 130 的烘箱中烘烤 1 h 去除附着在玻璃表面的水蒸汽。

1.2.3 曝光、显影 ITO玻璃的一侧已溅射一层厚度为 35 nm的 ITO薄膜, 其功能为导电发热, 另一侧则与普通玻璃无异。在没有 ITO 薄膜的玻璃一侧甩涂 AZ4620 光刻胶。甩胶结束, 将 ITO玻璃置于 80 烘箱内软烘 30 min。此时光刻胶厚度为 6 ~7 µm。软烘结束, 利用光刻机对玻璃基底进行紫外曝光。曝光后的 ITO 玻璃用显影液 AZ400K 显影,显影过程中不断晃动 ITO 玻璃, 使显影液与被曝光的感光胶充分接触, 加速感光胶和基底的分离。显影至被曝光部分的光刻胶完全去除为止。

1.2.4 刻蚀 将显影完成后的 ITO 玻璃置于 130 的烘箱中硬烘 30 min。硬烘过程可以降低光刻胶与玻璃基底的残余应力,蒸发去除光刻胶内的有机溶剂,增加光刻胶掩模层与玻璃基底表面的黏附力。由于 ITO 薄膜耐腐蚀效果较差,其在以 50 50 3 比例配置的 H₂O HCI HNO₃ 腐蚀液中耐受时间约为 40 s,因此,在硬烘完成,进行湿法腐蚀之前,需要对玻璃基底的 ITO 薄膜进行保护,以避免在刻蚀过程中 BOE 液将此薄膜腐蚀去除。保护方法如图 1(5) 所示,将 PDMS单体和固化剂以 10 1 混合均匀,脱气处理后浇注在 ITO 薄膜一侧,80 固化 1 h。待固化完成,将此玻璃基底置于 BOE 腐蚀液中进行刻蚀,刻蚀过程中通过磁力搅拌器不断搅拌,以形成所需要的微管道结构。腐蚀完毕,去除用于保护作用的 PDMS 薄层,即得到已刻蚀好微管道的玻璃基片,如图 3 所示。

1.2.5 PDMS薄膜盖片制作 将 PDMS单体与固化剂按 10 1 的比例均匀混合后, 脱气处理。将脱气处理后的 PDMS浇注在水平

放置的载玻片上,80 固化1 h。固化完成,切割成合适的大小用于后续与玻璃基片的键合。PDMS薄膜厚度为1 mm。

1.2.6 键合 刻蚀完成后的玻璃基片上的通道为开放性结构, 将其与其他平整表面键合即可形成密闭的培养通道。将此玻璃 基片与上一步骤制得的 PDMS薄膜置于等离子体刻蚀仪内,抽 真空后通入氧气,施加射频电压,取出玻璃基片和 PDMS薄膜, 小心粘合即完成两者的不可逆键合。

1.3 细胞培养装置及细胞培养

将加工完成的芯片与温度控制系统、进样系统、信号检测系统等整合成一个完整的细胞培养微系统,并在此微系统内培养PIEC。通过注射泵(PHD2000 Programmable, Havard Apparatus)供给培养液,通过 IX51 荧光显微镜和 DP70CCD(Olympus)完成信号检测。

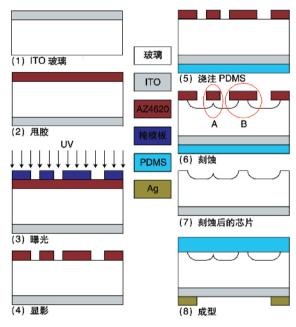


图 1 玻璃芯片的制作过程

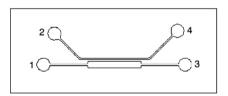


图 2 芯片的掩模板设计

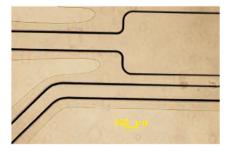


图 3 刻蚀后的玻璃芯片

2 结果和讨论

2.1 ITO 玻璃的腐蚀与钻蚀效应

2.1.1 ITO玻璃的腐蚀 在传统的玻璃微流控芯片制作工艺中,通常采用石英玻璃作为基质材料,但其价格较为昂贵,制作工艺复杂,且刻蚀速率较慢,需要长时间的刻蚀才能获得足够的深度。为此,通常需要在玻璃表面沉积一层薄膜材料作为刻蚀掩模层,如氧化硅、氮化硅、多晶硅和金属层。这些问题的存在极大地限制了玻璃在微流控芯片加工领域的应用。在此,我们采用商品化的 ITO 玻璃作为制作细胞培养芯片的基质材料。ITO 玻璃是钠玻璃的一种,其所含的 Na₂O、CaO、MgO 等杂质成分可以大大加快玻璃湿法腐蚀的速度^[12]。同时,为了简化制作工艺,降低成本,采用光刻胶 AZ4620 作为刻蚀掩模层;腐蚀液则采用 1 6 稀释的BOE 液,最大刻蚀深度可达到 110 μm。如图 4 所示,刻蚀时间与刻蚀深度呈较好的线性关系,平均刻蚀速度为 0.66 μm/min。

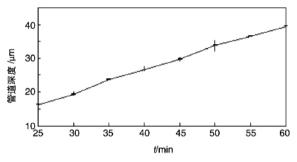


图 4 刻蚀时间对管道深度的影响

2.1.2 ITO玻璃腐蚀中钻蚀效应的应用 如前所述,在设计细胞培养芯片时必须考虑培养液流动所导致的机械力影响。液体在微管道内流动所形成的剪切力除了导致细胞形态改变之外,严重时甚至可能损伤细胞 ¹⁷。为了克服这一问题, Sarunas, Michael等在芯片设计时采用 "栅形"结构隔离培养液进样、出样区域和细胞培养区域,有效成分通过"栅形"结构扩散完成,成功实现了HeLa细胞在芯片上的培养^[13]。在此,我们则是利用玻璃在湿法刻蚀过程中的钻蚀效应一次成型来获得"坝型"结构,优化细胞培养芯片的设计。

玻璃湿法刻蚀是各向同性的,即刻蚀过程中腐蚀液不仅刻蚀掉深度方向的材料,而且几乎以同样的速度刻蚀掉侧壁的材料,我们称之为钻蚀效应。如图 1(6)所示,若刻蚀时间较长,宽度较小的管道壁 A 将被腐蚀击穿,形成"坝型"结构,而宽度较大的管道壁 B 则未被刻穿。管道壁宽度越小,刻蚀时间越长,"坝型"结构的高度越小。图 5 为使用台阶仪测得的"坝型"结构,其掩模板为图 2,刻蚀深度 A 为 39 μm, "坝型"结构高度为 31 μm,底部 D 最宽为 178 μm,培养液灌注通道的宽度 C 为 161 μm。图 6 为使用 femlab 对芯片内液体的流速模拟分析得到的结果,红色为流速较大处,蓝色为流速较小处;其中 A、B 幅为"坝型"结构下

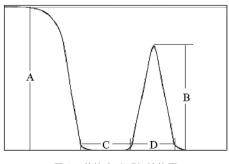


图 5 芯片内 "坝型"结构图

管道中部分别与进样方向平行、垂直的液体流速分布,左侧为培养液进样通道,右侧为细胞培养区域; C、D 幅为没有"坝型"结构的分析结果。由图 6 可见,使用"坝型"结构可以明显降低细胞培养区域液体的流速,从而减弱流体剪切力对细胞培养的影响。

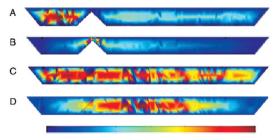


图 6 不同结构下芯片内液体的流速模拟分析

2.2 细胞培养芯片与其他结构的整合

2.2.1 温度控制 温度控制是细胞培养微系统的重要组成部 分,培养温度若不适当,将会影响细胞的代谢和生长,甚至使细 胞死亡。目前,细胞芯片微系统的加热源主要分为2类,即铜丝 导电发热的间接加热方式[14]和培养材料导电发热的直接加热方 式^[13]。为了满足长期观察和记录细胞活动的需要,我们以 ITO 玻 璃上的 ITO 薄膜为发热材料, 通过电极连入外部温度控制系统。 控制系统以 AD µC812 单片机为硬件核心, 以 PID 增量算法为软 件控制算法,主要包括温度信号采集、放大、滤波、单片机处理和 反馈控制等功能。实验过程中,温度控制目标为37,使用 Pt1000 电极在芯片表面采集温度数据, 上下波动小于 0.5。 2.2.2 气体供应 多数细胞需要在有氧条件下生长,一种可行 的供氧方法是将培养液通过氧小室、溶解氧气后再转回至细胞 培养芯片内,以此满足细胞培养过程中所需要的氧气。我们采用 PDMS薄膜作为芯片的盖片、除了利用它良好的生物兼容性之 外、其高透气性特点还可以满足细胞培养过程中细胞对氧气的 需求[15], 使我们在培养时不需要增加额外的气体供应装置, 简化 细胞培养微系统的整体设计。根据 Eric 等[15]的公式计算, 若芯片 内细胞每秒需氧量估计值为 X, PDMS 薄膜所能提供的氧气量每 秒最大值为 F_{max}, 本实验中, X 约为 1.36 x10⁻¹¹ mol/s, F_{max} 约为

细胞体外培养时,除氧的供应外,一般还需要 5%的 OO_2 分压。由于本微系统未使用专门的气体供应设备,为此,我们采用改进细胞培养液的方法来满足细胞生长过程中对 OO_2 的需求,并提供稳定的 pH 值 16 。添加 Leibovitz's L- 15 培养基的培养液在光照下具有高的稳定性,能够为细胞生长提供稳定的 pH 值,足量的 NaH OO_3 还能满足细胞对碳酸盐的需求。

8.2 x10⁻⁷ mol /s。F_{max}>>X, 说明采用 PDMS 薄膜完全可以满足细胞

2.3 芯片细胞培养测试

培养过程中细胞对氧的需求。

芯片用 75%酒精浸泡 1 h, 取出后放入培养皿中, 紫外灯照射 1 h。为了有利于细胞导入芯片后贴壁生长, 在导入细胞之前, 用注射器将培养液注入芯片内部, 将芯片浸润, 放置过夜, 使芯片内壁包壁一层蛋白。培养液采用 1640 培养基, 将其与 L- 15 培养基以 1 1 混合后, 补充 10%的胎牛血清、100 μg/mL 链霉素。用消化液(2.5 g/L 胰蛋白酶, 0.2 g/L EDTA 溶液) 将常规培养的 PIEC 消化、离心、吹打, 将细胞悬浊液的浓度调整到 4 x10°/mm³, 然后用注射器吸入细胞悬浊液, 通过注射泵缓慢注入芯片

内。将此已导入细胞的芯片和上述温度控制系统、进样系统、视频观察记录系统相连,细胞在2-3 h后贴壁生长。图7为培养72 h后的细胞,其生长情况良好;图8为CCD记录的细胞贴壁过程中形态的变化。

2.4 结语

本文介绍了一种利用 ITO 玻璃快速、低成本制作细胞培养芯片的方法。利用玻璃湿法刻蚀过程中的钻蚀效应, 在芯片内加工出"坝型"结构, 以分隔培养液进样通道和细胞培养区域, 减弱了培养液灌注过程中所产生的流体剪切力对细胞生长的影响。将此芯片与透气性的 PDMS薄膜键合, 并整和温度控制系统、视频观察系统等, 实现了 PIEC 在体外的培养, 为下一步研究细胞

迁移特性等提供了良好的基础。

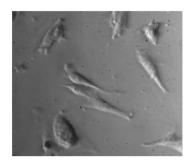


图 7 芯片内的细胞培养

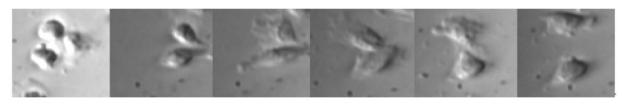


图 8 细胞在芯片内贴壁过程中的形态变化

参考文献

- [1] Jamil E A, Sorger P K, Jensen K F. Cells on chips[J]. Nature, 2006,442(7101):403-411.
- [2] Dittrich P S, Manz A. Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery[J]. Nat Rev Drug Discovery, 2006,5(3):210-218.
- [3] Saadi W, Wang S J, Lin F, et al. A parallel-gradient microfluidic chamber for quantitative analysis of breast cancer cell chemotaxis [J]. Biomed Microdevices, 2006,8(2):109-118.
- [4] Paul J, Hung P J L. A novel high aspect ratio microfluidic design to provide a stable and uniform microenvironment for cell growth in a high throughput mammalian cell culture array [J]. Lab on a Chip, 2005,5:44-48.
- [5] Torsten M T S, Gabriele G, Stephen G S, et al. Microdevice for cell and particle separation using dielectrophoretic field-flow fractionation[J]. J Liquid Chromatography Related Technol, 2000,23(1): 47-59.
- [6] Viravaidya K, Sin A, Shuler M L. Development of a microscale cell culture analog to probe naphthalene toxicity [J]. Biotechnol Prog, 2004,20(1):316-323.
- [7] Glenn M W, Heary C Z, David J B. Microenvironment design considerations for cellular scale studies [J]. Lab on a Chip, 2004,4: 91-97.
- [8] McDonald J C, Duffy D C, Anderson J R, et al. Fabrication of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane)[J]. Electrophoresis,

2000,21(1):27-40.

- [9] Jacqueline R R, Albert F. Large-scale single-cell trapping and imaging using microwell arrays[J]. Analytical Chem, 2005,77 (17): 5628-5634.
- [10] 邢婉丽,程京. 生物芯片技术[M]. 北京:清华大学出版社, 2004: 193-197.
- [11] Lin C H, L G B, Lin Y H, et al. A fast prototyping process for fabrication of microfluidic systems on soda-lime glass [J]. J Micromechanics Microeng, 2001,11:726-732.
- [12] Spierings G A C M.Compositional effects in the dissolution of multicomponent silicate glasses in aqueous HF solutions[J]. J Materials Sci, 1991,26:3329-3336.
- [13] Petronis S, Stangegaard M, Christensen C B, et al. Transparent polymeric cell culture chip with integrated temperature control and uniform media perfusion[J]. Biotechniques, 2006,40(3):368-376.
- [14] Lai S, Lee J L, Yu L Y, et al. Micro- and Nano-Fabrication of Polymer Based Microfluidic Platforms for BioMEMS Applications[C]. Materials Research Society Symposium Proceedings, 2002: 729.
- [15] Eric L, Yasuyuki S, Teruo F. Cell Culture in 3- Dimensional Microfluidic Structure of PDMS (polydimethylsiloxane)[J]. Biomed Microdevices, 2003,5(2):109-114.
- [16] Nobuyuki F, Wei Gu. handheld recirculation system and customized media for microfluidic cell culture[J]. Lab on a Chip, 2006,6(1): 149-154.