

基于流体动力单细胞高效捕获的微流控芯片结构研究进展

潘婷¹ 武园园^{*1} 郭广生^{1,2} 汪夏燕^{*1}

¹(北京工业大学化学系, 北京 100124) ²(中央民族大学国家安全研究院, 北京 100081)

摘要 单细胞分析对于重大疾病的早期诊断及治疗、药物筛选和生理病理过程的研究具有重要意义。微流控芯片能够精确控制单细胞的微环境,实时监测单细胞的行为,已成为单细胞分析的强大工具。单细胞捕获是单细胞分析的重要步骤。目前已报道了多种微流控芯片用于单细胞捕获的方法,其中基于流体动力的微流控芯片单细胞捕获方法具有操作方便、单细胞捕获效率高优点,受到研究人员的广泛关注及使用。为了全面了解基于流体动力的微流控芯片单细胞捕获方法的研究现状,掌握单细胞高效捕获的微流控芯片结构设计,实现单细胞精准快速分析,本文综述了基于流体动力的单细胞高效捕获(>70%)原理及微流控芯片结构,根据结构设计不同分为微井结构、微柱结构和旁路通道结构,介绍了单细胞高效捕获的微流控芯片优化过程,总结了微流控芯片的材质、结构特点及单细胞捕获效率等,对不同单细胞捕获结构的优势及不足进行了分析。最后,对基于流体动力的微流控芯片单细胞捕获方法的发展趋势进行了展望。

关键词 单细胞; 流体动力; 微流控芯片; 捕获; 评述

单细胞分析^[1-2]可为重大疾病早期诊断及治疗^[3]、药物筛选^[4-5]和细胞间相互作用^[6-7]等研究提供可靠的科学依据。微流控芯片通常具有与细胞尺寸相当的微通道结构,而且可根据实际需求设计微通道的尺寸与形状,已经成为单细胞分析的有力工具。此外,基于微流控芯片的单细胞分析具有样品消耗少^[8]、检测速度快^[9]、分析通量高等特点^[10],适于细胞样本量较少的检测。单细胞捕获^[11-14]是单细胞分析的重要环节,在捕获单细胞后才能进行后续的单细胞分析。由于微流控芯片具有高度可控性^[15]和较强的单细胞处理能力,目前已成为单细胞捕获的重要平台^[16]。

基于微流控芯片的单细胞捕获方法主要可分为两类:(1)基于一系列外力的捕获方法,如磁^[17]、光^[18]、声^[19]和电^[20]等;(2)基于流体动力的捕获方法^[21]。流体动力捕获法无需施加任何外力和标记^[22],仅依靠流体的流动和细胞形态的固有差异实现在微通道中捕获单细胞。该方法对细胞活性基本没有影响,是一种低成本、简单和高通量的单细胞捕获方法。此外,基于流体动力的微流控芯片具有制作工艺成熟、操作简单、易与其它分析功能集成等优势^[23],引起研究人员的关注。

随着微流控芯片的不断发展,对微流控芯片捕获单细胞的结构设计提出了更高的要求。对于珍稀细胞样品,如原代细胞或干细胞,需要提高单细胞的捕获率。目前已经报道了几种基于流体动力的微流控芯片结构设计,可实现单细胞的高效捕获,单细胞的捕获效率可达到 70%以上。根据微流控芯片结构设计不同主要分为微井结构^[24]、微柱结构^[25]和旁路通道结构^[26]。微井结构主要是设计与单细胞尺寸相匹配的微井,当细胞悬浮液流过时,由于细胞存在自身重力,单细胞可以沉降在每个独立的微井中,落入微井的细胞受到的流体冲击力很小,不容易被冲走^[27]。微柱结构用于捕获单细胞主要是在通道中设计各种形状及尺寸的挡板或者障碍物拦截单细胞^[28],使每个捕获结构尽量容纳单个细胞,当细胞悬浮液流过后可以形成单细胞捕获阵列。旁路通道结构是根据通道中不同位置的流体阻力不同^[29]而实现单细胞捕获。细胞悬浮液在沿着通道流动的过程中,单细胞会优先进入流体阻力较小的结构中。由于被捕获的单细胞起着塞子的作用^[30],捕获位点的流体阻力增加,因此随后的细胞沿着通道流动时,会绕过单细胞占据的捕获点,到达下一个捕获点。

2023-01-08 收稿; 2023-02-22 接受

国家自然科学基金项目(Nos. 22127805, 22176230)、北京高校卓越青年科学家计划项目(No. BJJWZYJH01201910005017)和中国博士后科学基金项目(No. 2022M710277)资助。

* E-mail: yuanyuanwu@bjut.edu.cn; xiyanwang@bjut.edu.cn

基于流体动力的微流控芯片单细胞捕获具有操作方便、结构设计简单以及单细胞捕获效率高等优势^[31],已成为单细胞捕获的重要方法。目前,基于流体动力的微流控芯片单细胞捕获方法缺乏系统和全面的综述。因此,本文详细介绍了基于流体动力的单细胞高效捕获原理及 3 种典型的微流控芯片结构,即微井结构、微柱结构和旁路通道结构,概述了 3 种结构的单细胞捕获原理、结构特点、单细胞捕获效率及每种结构的优缺点,并对基于流体动力的微流控芯片单细胞捕获结构的发展前景进行了展望。

1 基于流体动力的微流控芯片单细胞捕获方法及原理

基于流体动力的微流控芯片单细胞捕获主要是通过设计障碍物或者凹槽等微结构,利用结构与流体、细胞与流体以及细胞与结构之间的相互作用,通过对通道内流体及单细胞运动精确控制,实现单细胞捕获。

常用的基于流体动力的单细胞捕获方法主要包括确定性侧向位移技术(Deterministic lateral displacement, DLD)、惯性微流控技术和过滤技术。DLD^[32-34]主要利用流体的层流特性和细胞大小不同,当细胞与微柱阵列撞击后,二者会产生相互作用(图 1A)^[35],不同尺寸的细胞会沿不同方向流动。大于流体动力学临界尺寸的单细胞与微柱发生碰撞后会发生侧向偏移,随着流体流出微柱阵列;小于流体动力学临界尺寸的单细胞与微柱碰撞后不发生侧向偏移,单细胞被拦截在微柱之间的空隙中,从而实现单细胞捕获。因此,基于 DLD 可实现不同尺寸细胞的分离,也可以在微流控芯片的出口处设计单细胞捕获结构实现不同尺寸的单细胞捕获。在 DLD 单细胞捕获芯片中,临界尺寸(D_c)是最重要的一个参数,决定了细胞的偏转与否,因而明确临界尺寸与微柱阵列各参数之间的对应关系,并在此基础上针对特定分选对象设计出合理的微柱结构尤为重要。Davis 等^[36]在理论结合实验的基础上得出了被广泛应用的经验公式(1),从公式(1)可知,柱间间隙 G 及偏移系数 ϵ 越大,临界尺寸越大。

$$D_c = 1.4G\epsilon^{0.48} \quad (1)$$

惯性微流控技术^[37-38]利用不同尺寸的细胞受到的惯性升力不同和 Dean 涡流原理(图 1B)^[39],实现单细胞捕获。不同种类的细胞尺寸不同,单细胞的尺寸决定着细胞受到的惯性升力的大小,尺寸较大的单细胞向通道内壁方向移动,尺寸较小的单细胞向通道外壁方向移动,因此可以设计多个微流控芯片出口实现不同种类的细胞分离,也可以在不同的出口处设计单细胞捕获结构实现多种单细胞的捕获。惯性分选的微通道一般为直通通道、螺旋通道或二者混合使用。直通通道内的细胞受到壁面诱导升力和剪切诱导升力的共同作用,称为惯性升力(F_L);螺旋通道内的细胞受到 F_L 和弯道处二次流的 Dean 曳力作用。流体通道中细胞主要受到沿流线方向流体的拖拽力(F_D)和垂直于流线方向的 F_L 作用,惯性升力 F_L 的计算公式(2)^[40]和流体通道中细胞所受 F_D 的表达式(3)^[41]如下:

$$F_L = \frac{C_L \rho U_m^2 a_p^4}{D_h^2} \quad (2)$$

$$F_D = 3\pi\mu a_p U_D \quad (3)$$

其中, C_L 为无量纲的升力系数, ρ 为流体密度, U_m 为流体通道内流体的最高流速, a_p 为细胞直径, D_h 为水力直径。 μ 为流体的流体动力粘度, U_D 为 Dean 流的流速。由此可知,细胞所受惯性升力与细胞直径、流体通道内流体的流速及流体通道的尺寸相关。

过滤技术^[42-43]主要根据细胞的大小和可变形性能的差异,通过控制微筛或微孔的尺寸实现单细胞捕获。当细胞流经微筛或微孔等结构时,尺寸比较大或变形能力比较差的细胞就会被困在微筛或微孔上。该方法可以通过控制微筛或微孔的尺寸,在混合细胞样品中实现对某种单细胞的捕获(图 1C)^[44]。

2 基于流体动力的微流控芯片单细胞捕获结构

根据微流控芯片结构设计不同,常用的基于流体动力的微流控芯片单细胞捕获结构主要有微井结构、微柱结构和旁路通道结构。下面具体介绍每种结构的单细胞捕获原理、设计思路和具体应用,以期单细胞高效捕获的微流控芯片结构设计提供参考。

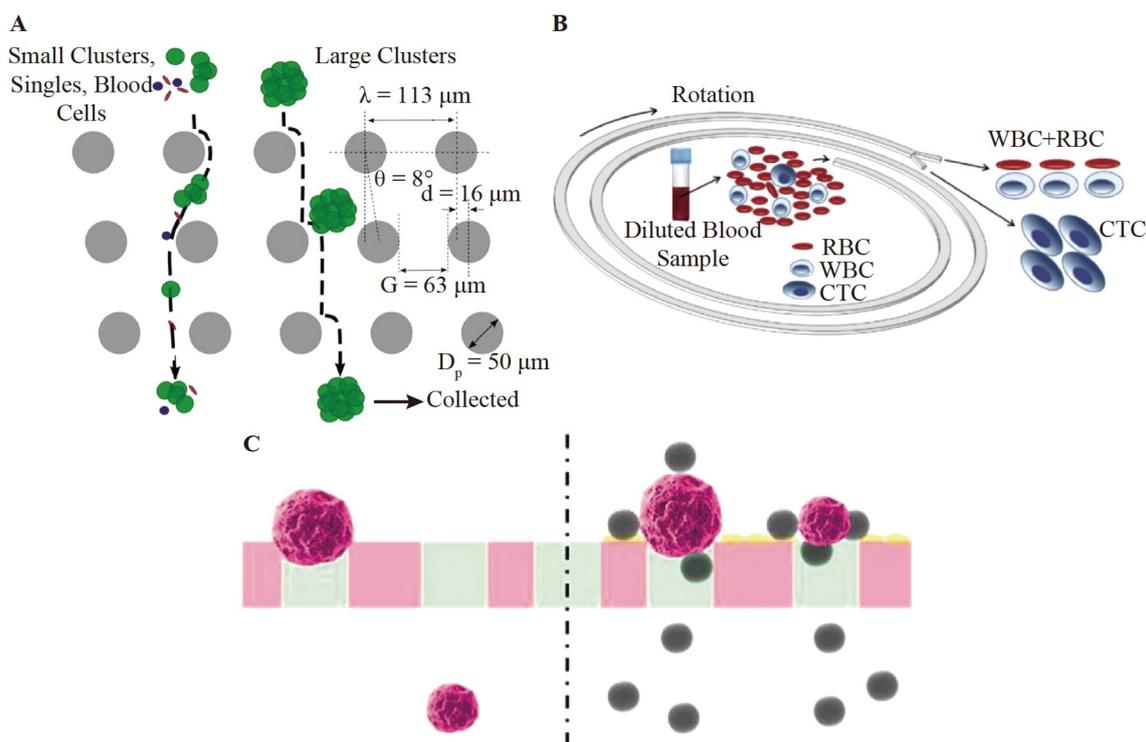


图1 常见的基于流体动力的单细胞捕获方法：(A)基于确定性侧向位移(DLD)的单细胞捕获^[35]；(B)基于惯性微流控的单细胞捕获^[39]；(C)基于过滤技术的单细胞捕获^[44]

Fig.1 Schematic diagram of single-cell capture methods based on hydrodynamics: (A) Deterministic lateral displacement (DLD)-based single cell capture^[35]; (B) Inertial microfluidics-based single cell capture^[39]; (D) Filtering technology-based single cell capture^[44]

2.1 基于微井阵列的单细胞捕获结构

基于微井阵列的单细胞捕获结构主要是利用重力沉降法,根据单细胞与微井尺寸相匹配的程度,实现在不同大小和形状的微井中捕获单细胞,这是最早用于单细胞捕获的结构设计之一。基于微井阵列的单细胞捕获根据过滤原理,首先将细胞悬浮液注入到微流控芯片中,静置一段时间,细胞由于自身重力作用会沉降到微井中;然后将多余的细胞冲走,完成单细胞捕获。基于微井阵列的单细胞捕获结构可以从大量细胞样本中捕获单细胞和细胞团簇,主要包括封闭式和开放式两种。

Jen 等^[45]采用软光刻技术在芯片上设计并制备圆形微井阵列结构,在捕获单细胞之后进行单细胞的化学裂解。该芯片由两层聚二甲基硅氧烷(Polydimethylsiloxane, PDMS)组成,上层是主流体通道,下层是圆形微井阵列,主流体通道与圆形微井阵列上下对应。主流体通道被分成 8 条独立的微通道,每条微通道长 45 mm、宽 1 mm(图 2A),每条微通道下面包含 15 个直径 20 μm、深度 20 μm 的 10 × 10 的微井阵列,微井的单细胞捕获率大于 80%。为了筛选瞬时受体电位通道调节剂, Ai 等^[46]设计了类似的结构,该芯片由两层 PDMS 组合而成。上层设计有流体通道,下层设计有直径 25 μm、深度 40 μm、间距 60 μm 的微井阵列,流体通道与微井阵列上下对齐(图 2B)。通过对微井间距、微井直径、微井密度等参数进行优化,芯片对单个人胚肾细胞(HEK-293T)的捕获效率可以达到 86.4% ± 3.6%。为了给单细胞培养提供足够的空间, Lin 等^[47]制备了两层的圆形双孔微井阵列结构。该芯片由两层 PDMS 键合到一起形成,一层是直径 25 μm、深度(30 ± 1) μm 的单细胞捕获井阵列,另一层是直径 285 μm、深度(300 ± 15) μm 的单细胞培养井阵列,单细胞捕获井与单细胞培养井上下对应。捕获井捕获单细胞后,翻转微流控芯片将捕获的单细胞转移到培养井中进行培养,其对单个人非小肺癌细胞(A549)的捕获效率可达到 90%。

随着单细胞捕获率不断提高,研究人员对于如何在提高单细胞捕获效率的基础上提高单细胞的利用率进行了探究。如对上述微井结构进行改进,将半封闭式的微井结构改成通孔结构,这种通孔结构为提

高单细胞的利用率提供了可能。Osdak 等^[50]制备了圆形通孔单细胞捕获结构,该芯片由 PDMS 和聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)组成,上层是 PDMS 方形细胞引入室,中间是直径 $3\ \mu\text{m}$ 的圆形 PET 通孔,下层是方形凹槽。方形细胞引入室、圆形通孔和方形凹槽上下对应,上层方形槽用于细胞引入,圆形通孔用于单细胞捕获,下层方形凹槽用于控制压力实现单细胞捕获。采用该结构捕获单个酵母细胞的效率可以达到 90%。为了解决捕获单细胞的释放问题, Lipp 等^[48]制备了类似的结构,该芯片由 PDMS 和玻璃两部分组成。上层设计有高 $30\ \mu\text{m}$ 的流体通道,下层设计有直径 $5\ \mu\text{m}$ 的圆形玻璃通孔阵列(图 2C),流体通道与圆形通孔上下对应。通过在下层通道的出口处施加一定的压力,可以利用圆形通孔实现单细胞捕获,对结肠癌单细胞(Colo205)的捕获效率可达到 88.4%。

为了方便对捕获的单细胞直接进行操作及处理,研究人员设计了开放式的微井阵列微流控芯片。Wang 等^[51]制备了圆形双井阵列芯片用于单细胞捕获。该芯片没有盖片,只有单层的 PDMS 底片,底片设计有阵列双井结构,每个双井包括直径 $20\ \mu\text{m}$ 、深度 $20\ \mu\text{m}$ 的单细胞捕获井和直径 $100\ \mu\text{m}$ 、深度 $20\ \mu\text{m}$ 的反应井,捕获井在反应井的下方中间位置,相邻双井中心之间的距离为 $200\ \mu\text{m}$ 。细胞依靠重力沉积到单细胞捕获井中,之后反应井中的多余细胞被磷酸盐缓冲液冲出。单细胞捕获效率可达到 75.8%,并在单细胞水平测定了人慢性髓原白血病细胞(K562)内的 β -半乳糖苷酶活性。为了便于准确定位单个细胞, Wu 等^[49]设计并制备了超薄可控温的开放式圆形微井阵列芯片,用于单细胞捕获(图 2D)。该芯片采用超薄亲水性氧化铟锡玻璃(ITO)作为底板,疏水性 SU-8 光刻胶作为壁,根据细胞自身重力及亲水性实现单细胞捕获。此外,每个微井都进行了数字编码,能够准确定位单个细胞,解决了细胞在培养时因细胞分裂或迁移而无法找到相同单细胞的问题,该芯片用于人肺癌单细胞(A549-mcherry)的捕获率接近 100%。

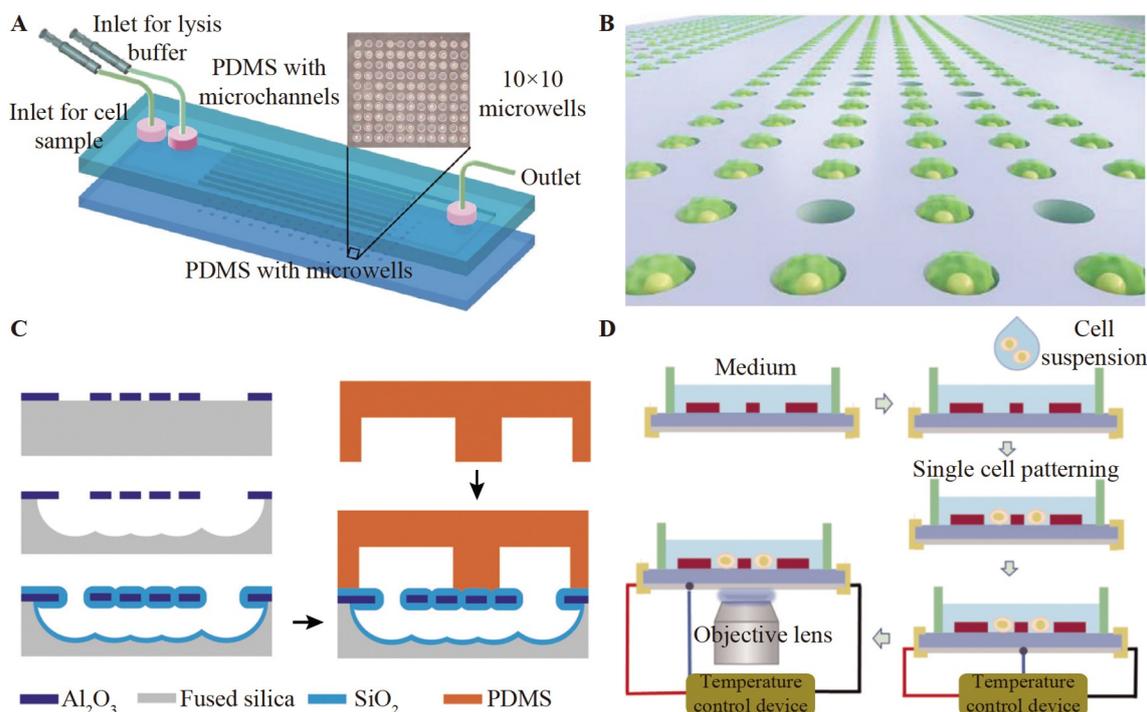


图2 基于微井阵列的单细胞捕获结构:(A)圆形微井阵列结构^[45]; (B)圆形微井结构^[46]; (C)圆形通孔结构^[48]; (D)开放式微井结构^[49]

Fig.2 Schematic diagram of single-cell capture structures based on microwell arrays: (A) Circular microwell array structure^[45]; (B) Circular microwell structure^[46]; (C) Circular through-hole structure^[48]; (D) Open microwell structure^[49]

基于微井阵列的单细胞捕获结构的优势在于单细胞一旦被捕获,细胞将被固定在微井阵列上的特定位置,可以使用显微镜对数千个单细胞的瞬态特性进行连续观察及图像采集。基于微井阵列的单细胞捕获结构具有高通量和操作简便等优点,但是单细胞的分布符合泊松分布规律,会出现微井中未捕获单细

胞或捕获多个单细胞的现象,另外,在微井中不方便控制溶液的交换。

2.2 基于微柱阵列的单细胞捕获结构

微柱阵列结构是单细胞捕获的常用结构之一,是根据单细胞尺寸大小设计微挡板或障碍物,通过对微柱阵列结构的尺寸优化,能够最大程度保证每个微柱结构只捕获单个细胞。基于微柱阵列的单细胞捕获根据 DLD 原理,通过让细胞沿着流体通道流动,在流体流线的带动下,利用微柱阵列捕获单细胞。当单细胞被微柱结构捕获后,该位置的流体阻力会增加,降低了捕获其它细胞的可能性。从单细胞到细胞团簇,从全血样本到裂解样本,都可以被特定形状和尺寸的微柱结构捕获。

Di Carlo 等^[52]设计并制作了半圆形微柱结构,用于高通量单细胞捕获(图 3A)。该芯片由 PDMS 与玻璃两部分键合而成,PDMS 盖片上的半圆形结构高 $40\ \mu\text{m}$,半圆形阵列用于单细胞捕获,未捕获细胞及溶液由阵列结构间的空隙流过。PDMS 盖片上的半圆形阵列与玻璃底片间具有 $2\ \mu\text{m}$ 的间隙,当细胞悬浮液通过时,单个细胞会被捕获在半圆形结构中。利用这种结构设计,可以实现高通量单细胞捕获,调节半圆形微柱结构的大小与单细胞尺寸相匹配,可以提高单细胞捕获效率以进一步分析细胞内羧酸酯酶浓度。Chen 等^[53]在该结构的基础上进行了优化,将半圆形微柱结构修改为方形,利用相似的原理捕获单细胞,这种方形结构在单细胞捕获和释放的过程中能够最大限度地减少细胞堵塞。该芯片由硅片和玻璃两部分组合而成,硅片上的方形阵列结构高度为 $14\ \mu\text{m}$,用于单细胞捕获。硅片上的方形阵列结构与玻璃间具有 $6\ \mu\text{m}$ 的间隙,当细胞悬浮液通过时,单个细胞被捕获在方形结构中,从而将 $6\ \mu\text{m}$ 的间隙堵塞。基于此芯片,白细胞(Leukocyte)的单细胞捕获效率约为 84%。

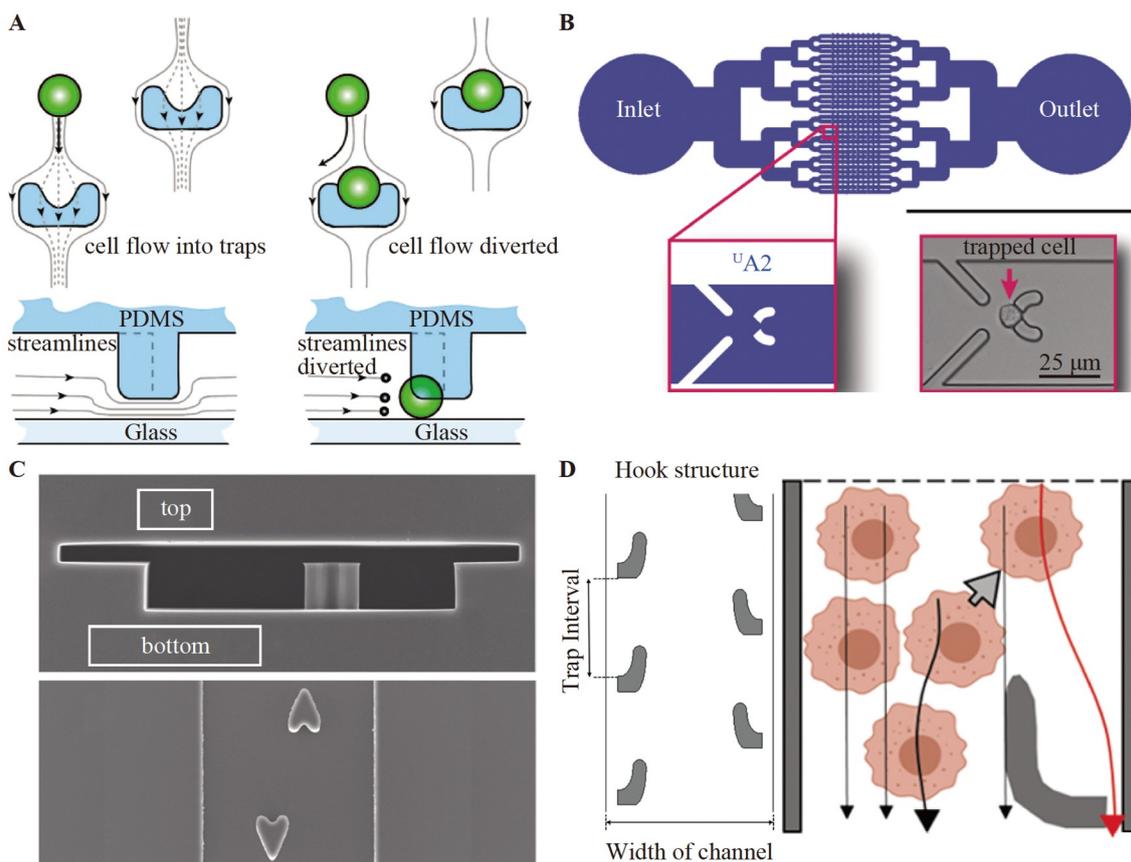


图3 基于微柱阵列的单细胞捕获结构: (A)半圆形微柱单细胞捕获结构^[52]; (B)半圆弧微柱单细胞捕获结构^[54]; (C)心形微柱单细胞捕获结构^[56]; (D)钩状微柱单细胞捕获结构^[57]

Fig.3 Schematic diagram of single-cell capture structures based on microcolumn arrays: (A) Semicircular micropillar single-cell capture structure^[52]; (B) Semicircular arc micropillar single-cell capture structure^[54]; (C) Heart-shaped micropillar single-cell capture structure^[56]; (D) Hook-shaped micropillar single-cell capture structure^[57]

半圆形及方形微柱结构流体阻力大,容易造成微流控芯片内高压,不利于单细胞捕获和保持细胞自身的完整性。研究人员在上述微柱结构的中间位置设计小空隙,结构改进后流体可以从捕获结构的间隙流过,降低了单细胞在捕获结构中承受的剪切力,尤其适用于对压力比较敏感的细胞。Yesilkoy 等^[54]制备了中间带有 2~3 μm 空隙的半圆弧微柱阵列结构,用于高通量的单细胞捕获和培养(图 3B)。该芯片由 PDMS 和盖玻片组成。PDMS 层包括带有空隙的半圆弧单细胞捕获结构阵列,该结构减少了单细胞捕获过程中单细胞承受的机械力。每个捕获结构的前面设计了一个流体聚焦结构,降低了单细胞捕获的随机性,单细胞捕获效率可以达到 70%。为了给单细胞培养提供足够的空间,Chen 等^[55]设计了具有切口的 U 形结构用于单细胞捕获和培养。该芯片由玻璃盖片和底层的 PDMS 组成。PDMS 层由上层矩形流体通道和下层圆形井组成,流体通道和井深均为 50 μm ; 矩形流体通道用于输送细胞悬浮液,圆形井为单细胞培养提供足够的空间。每个圆形井的中间有一个宽 27 μm 的 U 形结构用于捕获单细胞, U 形结构的中间带有宽 10 μm 的切口。该芯片结构对人慢性髓原白血病单细胞(K562)的捕获效率达到 78.9%。

随着微柱结构用于单细胞捕获效率的提高,利用微柱结构进行细胞间相互作用、临床检测等生物学及医学研究也逐渐增多。Zhu 等^[56]设计并制备了面对面的心形微柱结构,用于单细胞捕获以及细胞之间的相互作用的研究(图 3C)。该芯片由两层 PDMS 键合而成,上层由 8×10 独立腔室组成,下层设计有通道,通道内包含方向相反的用于单细胞捕获的心形微柱结构,该心形微柱结构与上层腔室上下对应。捕获结构由一个心形突起和腔室之间的间隙组成,该间隙和底层通道用于流体流过,允许一小部分流体流线接触心形微柱,以捕获单细胞,将细胞限制在固定的空间。当两种细胞悬浮液依次从相反的方向引入心形捕获结构时,其中一个方向的心形结构捕获一种单细胞,相反方向的心形结构捕获另一种单细胞,该结构设计可以实现细胞配对。该结构的单细胞捕获效率可以达到 93%,并分析了单个癌细胞(HeLa)与单个基质细胞(HUVEC)共培养的增殖能力,证明了 HUVEC 能促进 HeLa 细胞的增殖。Ganguly 等^[57]设计了钩状单细胞捕获结构,用于宿主-病毒相互作用研究。该芯片由 PDMS 和玻璃两部分键合而成。PDMS 层包括 9 条高 25 μm 的平行通道,每条通道包含 50 个沿着通道两侧交替放置的钩状单细胞捕获结构(图 3D)。单细胞捕获结构由通道侧壁和一个钩状结构两部分组成,钩状结构与通道壁之间有一定的间隙。该结构的单细胞捕获率可以达到 95%以上。

基于微柱阵列的单细胞捕获结构通常在主流体通道上设计单细胞拦截物,该结构主要包括 U 形、半圆形和钩形等形状,通过控制流体流动实现单细胞捕获。单细胞捕获结构通常是单层的,制作工艺成熟、操作方便,而且能够通过阵列结构的设计实现高通量单细胞捕获。此外,微柱结构的设计为单细胞的灌流培养提供了一定的支撑力,可以降低细胞受到的拉伸应力,提高细胞活性。但是,基于微柱阵列的单细胞捕获结构通常和主流体通道平行,会造成捕获的单细胞分布不均,细胞捕获处的局部流体阻力增大,容易造成通道堵塞及多细胞聚集的现象。此外,捕获单细胞的释放还有一定的发展空间。

2.3 基于旁路通道的单细胞捕获结构

基于微柱阵列的单细胞捕获结构通常与主通道流体流动方向垂直,而基于旁路通道的单细胞捕获结构多与主通道流体流动方向平行,通常由一个捕获点和捕获点侧通道组成。该结构主要根据 DLD 和惯性微流控原理,在微流控芯片中设计流阻较大的主通道和流阻较小的侧通道,当细胞在主通道中流动时,由于主通道和侧通道之间存在压力差,细胞会被推向流阻较小的侧通道,通过在主通道与侧通道的连接处设计特殊的捕获结构,实现单细胞捕获。由于被捕获的单细胞在捕获点起着塞子的作用,因此该捕获点的流体阻力增加;当细胞悬浮液沿着主通道流动时,会绕过单细胞已经占据的捕获点进入下一个捕获点。该结构设计减少了通道堵塞和多细胞聚集的现象,降低了细胞损伤。基于旁路通道的单细胞捕获结构提供了一种按顺序捕获单细胞和细胞团簇的方法,此外,细胞分裂时子细胞的分离也可以在该结构中完成。

Kobel 等^[58]在主通道中设计带有侧通道的半圆形凹槽结构,该芯片由 PDMS 和玻璃两部分键合而成(图 4A)。PDMS 层包含主通道和基于旁路通道的半圆形凹槽单细胞捕获结构,主通道中的半圆形凹槽通过侧通道与另外的主通道相连。半圆形凹槽的中间位置设计有一个宽 3 μm 的侧通道,当细胞悬浮液流经凹槽时,主通道和侧通道之间存在的压力差将单细胞推进凹槽,单细胞被侧通道拦截。该方法可以

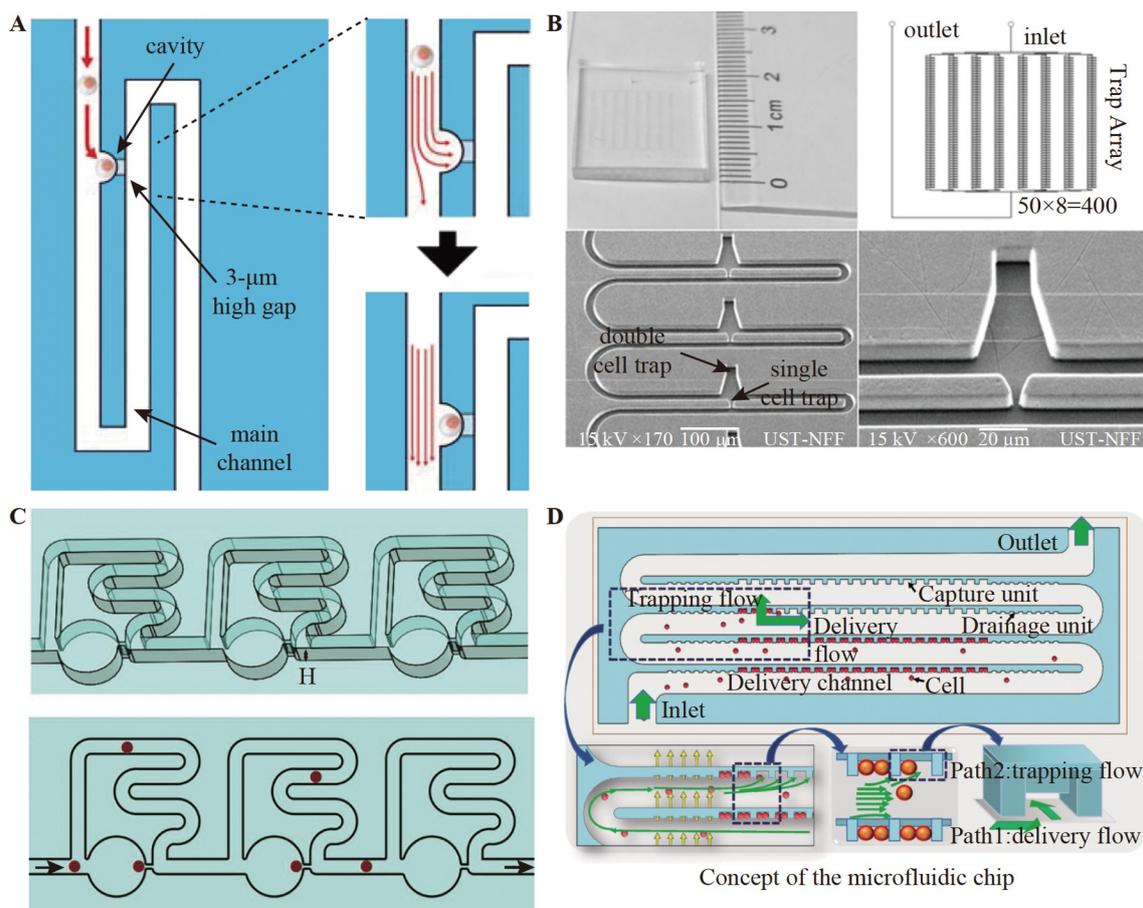


图4 基于旁路通道的单细胞捕获结构: (A)半圆形单细胞捕获结构^[58]; (B)V形单细胞捕获结构^[60]; (C)圆形单细胞捕获结构^[61]; (D)方形单细胞捕获结构^[62]

Fig.4 Schematic diagram of single-cell capture structures based on bypassing channels: (A) Semicircular single-cell capture structure^[58]; (B) V-shaped single-cell capture structure^[60]; (C) Circular single-cell capture structure^[61]; (D) Square single-cell capture structure^[62]

减少捕获结构液体的流通,从而实现单细胞捕获。该结构单细胞捕获效率可以达到 97%。随着单细胞捕获效率的不断提高,单细胞捕获过程的细胞损失问题引起了关注。针对该问题, Sauzade 等^[59]在主通道中添加了三角形的流线聚焦结构,降低了单细胞捕获过程中的细胞损失。该芯片由 PDMS 和玻璃两部分键合而成。PDMS 层由蛇形的主通道和基于旁路通道的方形凹槽单细胞捕获结构组成,主通道中的方形凹槽通过侧通道与另外的主通道相连接。单细胞捕获效率可以达到 99%。为了在单细胞捕获后研究细胞间的相互作用, Li 等^[60]在 V 形单细胞捕获结构的基础上设计梯形细胞培养室。该芯片由 PDMS 和玻璃两部分键合而成, PDMS 层由 8 列蛇形单细胞捕获通道组成,每一列包含 50 个单细胞捕获/培养位点。该单细胞捕获/培养位点包含梯形培养室和宽 $5\ \mu\text{m}$ 的 V 形捕获结构,培养室与捕获结构相对(图 4B)。该方法对单细胞的捕获效率可以达到 74%,通过离心力将捕获的单细胞移动到细胞室,可以用于研究细胞间的相互作用。

捕获单细胞后,为了进行长时间培养及细胞间相互作用的研究,研究人员在微流控芯片增加了独立的腔室,为单细胞研究提供足够的空间。He 等^[63]设计并制备了带有圆形大腔室的结构用于单细胞捕获和培养。该芯片由 PDMS 和玻璃两部分键合而成, PDMS 层包含直径 $500\ \mu\text{m}$ 的圆形大腔室和长 $6\ \mu\text{m}$ 、宽 $6\ \mu\text{m}$ 、高 $4.6\ \mu\text{m}$ 的方形凹槽单细胞捕获结构,主通道中的方形凹槽通过侧通道与圆形大腔室相连。单个淋巴内皮细胞(LECs)的捕获效率为 $70.83\% \pm 15.42\%$,通过调节流体方向,单细胞可以回流到培养室。为了一步实现单细胞捕获及培养, Sun 等^[61]设计了类似的结构,该结构无需调节流体方向,可以一步实现单细胞捕获和培养,操作简便。该芯片由 PDMS 和玻璃两部分键合而成, PDMS 层包含中间有

7 μm 空隙的圆形单细胞捕获腔室和宽 25 μm 的主通道(图 4C)。主通道由直通道和蛇形通道组成,蛇形通道的设计提高了主通道的流体阻力,单细胞更倾向于进入捕获点。采用该结构,非小肺癌细胞(A549)和人慢性髓原白血病细胞(K562)的单细胞捕获效率分别为 $82.7\% \pm 2.4\%$ 和 $84.0\% \pm 3.3\%$ 。

上述结构的单细胞捕获通量较低,为了实现单细胞的高效、高通量捕获,又能满足生物学研究的需要,研究人员在主通道中设计凹槽阵列单细胞捕获结构,并将流体入口方向调整为与主通道垂直。Chunk 等^[64]制备了方形凹槽阵列结构,用于单细胞捕获。该芯片由 PDMS 和玻璃两部分键合而成。PDMS 层包含高密度的方形单细胞捕获结构和蛇形主通道。蛇形主通道宽 25 μm 、高 14 μm , 单细胞很容易通过而不堵塞通道。每个蛇形主通道中间包括 24 个长 3.3~8 μm 、宽 8~15 μm 、高 14~16 μm 的方形单细胞捕获结构,方形结构的一侧与玻璃有 1.8 μm 的间隙,通道的两端各有 8 个虚拟捕获结构,虚拟捕获结构有利于单细胞进入捕获位点,捕获单元密度可以达到 860 cells/ mm^2 ,单细胞捕获效率可以达到 95%。Liu 等^[62]制备了类似的结构,由 PDMS 和玻璃键合而成。PDMS 层包括长 15 μm 、宽 30 μm 、高 16 μm 的方形单细胞捕获结构、方形多细胞捕获结构以及蛇形细胞输送通道(图 4D)。每个方形捕获结构的一侧与玻璃之间都有 3.5 μm 的间隙,有利于流体流动促进单细胞捕获,并且在每行方形捕获结构的两端都有排水结构,排水结构的空隙小于捕获结构,能够引导单细胞靠近捕获点。该芯片的单细胞捕获率可以达到 97%。为了实现高通量单细胞分析,Liu 等^[65]提出了一种类似的 U 形单细胞捕获结构,由 PDMS 和玻璃键合而成。PDMS 层包括蛇形通道和具有 6 μm 切口的直径 25 μm 的 U 形槽结构,蛇形通道用于细胞输送,U 形槽用于单细胞捕获,单细胞捕获效率可达到 95%。该芯片在 1 mm^2 的面积内包含 200 个捕获结构,可以使用 20 \times 物镜同时观察 100 个单细胞。该芯片易于大规模扩展,可作为高通量单细胞分析的工具。

基于旁路通道的单细胞捕获结构可以实现高通量单细胞捕获。在单细胞捕获时能够避免细胞堵塞,可以保持较高的细胞活力(>90%)和单细胞捕获效率(>90%)。但是,该结构可能需要更复杂的辅助设备完成实验,例如,可能需要高速摄像机记录细胞快速变形和运动的过程。

综上,3 种单细胞捕获结构各有特点,其性能比较见表 1。

表1 基于流体动力的3种单细胞捕获结构比较

Table 1 Comparison of three kinds of single cell capture structures based on hydrodynamics

单细胞捕获结构 Structure	单细胞捕获原理 Principle	优点 Advantage	缺点 Disadvantage	应用 Application	参考文献 Ref.
基于微井阵列的单细胞捕获结构 Microwell array structure	过滤原理 Filtration principle	易操作, 通量高 Easy to operate, high throughput	单细胞分布不均, 交换溶液不易 Uneven distribution of single cells, solution exchange not easy	单细胞捕获, 细胞培养, 单细胞 RNA 测序 Single-cell capture, cell culture, single-cell RNA-seq	[24,27] [43-45]
基于微柱阵列的单细胞捕获结构 Microcolumn array structure	确定性侧向位移原理 DLD principle	细胞损伤低, 利于细胞培养 Reduce cell damage, provide support for cell culture	通道易堵塞, 细胞分布不均 Channel easy clogging, uneven distribution of single cells	单细胞捕获和培养, 细胞配对, 细胞药物分析 Single-cell capture and culture, cell pairing, cell drug analysis	[25,28] [49,52]
基于旁路通道的单细胞捕获结构 Bypass-channel structure	确定性侧向位移原理, 惯性微流控原理 DLD and inertial principles	样品损失少, 捕获效率高 Less sample loss, high-efficiency	设备要求高, 不宜单细胞长期培养 High equipment requirements, not suitable for long-term single cell culture	单细胞捕获, 单细胞液滴分析, 单细胞 RNA 测序 Single-cell capture, single cell droplets analysis, single-cell RNA-seq	[29-30] [56-58]

3 结论与展望

本文阐述了基于流体动力的单细胞捕获原理,主要包括 DLD 技术、惯性微流控技术和过滤技术;

综述了基于流体动力单细胞高效捕获的微流控芯片结构的研究进展,总结了基于微井阵列的单细胞捕获结构、基于微柱阵列的单细胞捕获结构和基于旁路通道的单细胞捕获结构的优势与不足。基于微井阵列的单细胞捕获结构可以实现高通量单细胞捕获,但是会出现微井中未捕获单细胞或捕获多个单细胞的现象。基于微柱阵列的单细胞捕获结构为单细胞的灌注培养提供了一定的支撑力,减少了细胞损伤,但是该结构容易出现通道堵塞及多细胞聚集的现象。基于旁路通道的单细胞捕获结构可以避免细胞堵塞,单细胞捕获效率较高,但是该结构可能需要更复杂的辅助设备。基于微井阵列结构的单细胞捕获率最高可接近 100%,基于微柱阵列结构的单细胞捕获率最高可以达到 95%左右,基于旁路通道结构的单细胞捕获率最高可以达到 97%左右。

尽管基于流体动力的微流控芯片单细胞捕获具有操作方便、结构设计简单、单细胞捕获效率高等优势,但是仍然存在一些需要解决的问题,例如对珍稀细胞样品和容易变形的细胞存在细胞利用率低的问题。从现有的微流控芯片结构设计来看,通孔结构的设计可能有利于提高单细胞的利用率。此外,还可以在微流控芯片上集成单细胞捕获区域和单细胞分析区域,减少中间过程的样品损失,简化单细胞的分析步骤,一定程度上提高了单细胞的利用率。

单细胞捕获作为单细胞分析与细胞生物学研究的重要方法,对于疾病诊断和药物筛选等方面具有重要意义。随着微流控技术的快速发展,基于流体动力的微流控芯片单细胞捕获方法将更加完善。单细胞捕获方法可以与质谱检测等高通量、高灵敏度的检测方式结合,加快细胞生物学的研究进程,为单细胞分析的快速发展和细胞生物学研究提供有力的支撑。

References

- [1] SUN J, GAO L, WANG L, SUN X. *Talanta*, 2021, 234: 122671.
- [2] LUO X, CHEN J Y, ATAEI M, LEE A. *Biosensors*, 2022, 12(2): 58.
- [3] LIU Y, CHEN L, YU J, YE L, HU H, WANG J, WU B. *Environ. Sci. Technol.*, 2022, 56(16): 11132-11145.
- [4] WANG C, HU W, GUAN L, YANG X, LIANG Q. *Chin. Chem. Lett.*, 2022, 33(6): 2883-2892.
- [5] ABDULLA A, ZHANG Z, AHMAD K Z, WARDEN A R, LI H, DING X. *Biosens. Bioelectron.*, 2022, 201: 113965.
- [6] YANG W, QIN Y, WANG Z, YU T, CHEN Y, GE Z. *Sens. Actuators, A*, 2022, 333: 113229.
- [7] PARK J, PARK C, SUGITANI Y, FUJII T, KIM S H. *Lab Chip*, 2022, 22(16): 3000-3007.
- [8] ZHANG Nai-Qian, FANG Qun. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2021, 49(11): 1779-1991.
张乃倩, 方群. *分析化学*, 2021, 49(11): 1779-1991.
- [9] XU Lin-Long, JIN Zhi-Ming, FAN Yi-Qiang. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2022, 50(4): 506-515.
徐林龙, 金志明, 范一强. *分析化学*, 2022, 50(4): 506-515.
- [10] ZHOU W, YAN Y, GUO Q, JI H, WANG H, XU T, MAKABEL B, PILARSKY C, HE G, YU X, ZHANG J. *J. Nanobiotechnol.*, 2021, 19(1): 312.
- [11] PANG L, DING J, LIU X X, YUAN H, GE Y, FAN J, FAN S K. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2020, 129: 115940.
- [12] FALLAHI H, CHA H, ADELNIA H, DAI Y, TA H T, YADAV S, ZHANG J, NGUYEN N T. *Nanoscale Horiz.*, 2022, 7(4): 414-424.
- [13] ZHANG H, LU M, XIONG Z, YANG J, TAN M, HUANG L, ZHU X, LU Z, LIANG Z, LIU H. *Lab Chip*, 2022, 22(10): 1951-1961.
- [14] LIU Y C, ANSARYAN S, LI X, ARVELO E R, ALTUG H. *Biosens. Bioelectron.*, 2022, 202: 113955.
- [15] ZHANG W, LI Q, JIA F, HU Z, WEI Z. *Anal. Chem.*, 2021, 93(29): 10099-10105.
- [16] MURALIDHARAN A, PESCH G R, HUBBE H, REMS L, NOURI-GOUSHKI M, BOUKANY P E. *Bioelectrochemistry*, 2022, 147: 108197.
- [17] MURPHY T W, ZHANG Q, NALER L B, MA S, LU C. *Analyst*, 2017, 143(1): 60-80.
- [18] WANG H, ENDERS A, PREUSS J A, BAHNEMANN J, HEISTERKAMP A, TORRES-MAPA M L. *Sci. Rep.*, 2021, 11(1): 14584.
- [19] RICHARD C, DEVENDRAN C, ASHTIANI D, CADARSO V J, NEILD A. *Lab Chip*, 2022, 22(18): 3533-3544.
- [20] VALIZADEH A, KHOSROUSHAHI A Y. *Anal. Methods*, 2015, 7(20): 8524-8533.
- [21] LUAN Q, MACARANIAG C, ZHOU J, PAPAUTSKY I. *Biomicrofluidics*, 2020, 14(3): 031502.
- [22] NARAYANAMURTHY V, NAGARAJAN S, FIRUS KHAN A Y, SAMSURI F, SRIDHAR T M. *Anal. Methods*, 2017, 9(25): 3751-3772.
- [23] FENG C, MAO D, LU C, ZHANG Q, LIU X, WU Q, GONG X, CHEN G, ZHU X. *Anal. Chem.*, 2021, 93(2): 1110-1119.

- [24] ANDERSSON M, JOHANSSON S, BERGMAN H, XIAO L, BEHRENDT L, TENJE M. *Lab Chip*, 2021, 21(9): 1694-1705.
- [25] LIU Z, HUANG Y, LIANG W, BAI J, FENG H, FANG Z, TIAN G, ZHU Y, ZHANG H, WANG Y, LIU A, CHEN Y. *Lab Chip*, 2021, 21(15): 2881-2891.
- [26] WANG K, ZHOU L, ZHAO S, CHENG Z, QIU S, LU Y, WU Z, WAHAB A H A A, MAO H, ZHAO J. *Talanta*, 2019, 200: 169-176.
- [27] TAYEBI M, O'RORKE R, WONG H C, LOW H Y, HAN J, COLLINS D J, AI Y. *Small*, 2020, 16(17): 2000462.
- [28] SZÉLES E, NAGY K, ÁBRAHÁM Á, KOVÁCS S, PODMANICZKI A, NAGY V, KOVÁCS L, GALAJDA P, TÓTH S Z. *Cells*, 2022, 11(2): 285.
- [29] KHAJVAND T, HUANG P, LI L, ZHANG M, ZHU F, XU X, HUANG M, YANG C, LU Y, ZHU Z. *Lab Chip*, 2021, 21(24): 4823-4830.
- [30] GRIGOREV G V, NIKITIN N O, HVATOV A, KALYUZHNYAYA A V, LEBEDEV A V, WANG X, QIAN X, MAKSIMOV G V, LIN L. *Micromachines*, 2022, 13(3): 367.
- [31] CHEN Y, ZHOU Z, ZHU S, NI Z, XIANG N. *Microchem. J.*, 2022, 177: 107284.
- [32] TANG H, NIU J, PAN X, JIN H, LIN S, CUI D. *J. Chromatogr. A*, 2022, 1679: 463384.
- [33] GILLAMS R J, CALERO V, FERNANDEZ-MATEO R, MORGAN H. *Lab Chip*, 2022, 22(20): 3869-3876.
- [34] VARMAZYARI V, GHAFORIFARD H, HABIBIYAN H, EBRAHIMI M, GHAFOURI-FARD S. *J. Mol. Liquids*, 2022, 349: 118192.
- [35] AU S H, EDD J, STODDARD A E, WONG K H K, FACHIN F, MAHESWARAN S, HABER D A, STOTT S L, KAPUR R, TONER M. *Sci. Rep.*, 2017, 7(1): 2433.
- [36] DAVIS J A. *Microfluidic Separation of Blood Components through Deterministic Lateral Displacement*. Princeton University, 2008.
- [37] AKBARNATAJ K, MALEKI S, REZAEIAN M, HAKI M, SHAMLOO A. *Talanta*, 2023, 254: 124125.
- [38] SHIRINY A, BAYAREH M. *Chem. Eng. Sci.*, 2021, 229: 116102.
- [39] AYASH A A. *Chem. Eng. Sci.*, 2023, 265: 118235.
- [40] ASMOLOV E S. *J. Fluid Mech.*, 1999, 381: 63-87.
- [41] MARTEL J M, TONER M. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2014, 16(1): 371-396.
- [42] YAO X Y, LIU Y, CHU Z Y, JIN W Q. *Chin. J. Chem. Eng.*, 2022, 49: 1-20.
- [43] LI H, LI J, ZHANG Z, GUO Z, ZHANG C, WANG Z, GUO Q, LI C, LI C, YAO J, ZHENG A, XU J, GAO Q, ZHANG W, ZHOU L. *Microsyst. Nanoeng.*, 2022, 8(1): 23.
- [44] SUN N, LI X, WANG Z, LI Y, PEI R. *Biosens. Bioelectron.*, 2018, 102: 157-163.
- [45] JEN C P, HSIAO J H, MASLOV N A. *Sensors*, 2012, 12(1): 347-358.
- [46] AI X, WU Y, LU W, ZHANG X, ZHAO L, TU P, WANG K W, JIANG Y. *Adv. Sci.*, 2020, 7(11): 2000111.
- [47] LIN C H, HSIAO Y H, CHANG H C, YEH C F, HE C K, SALM E M, CHEN C, CHIU I M, HSU C H. *Lab Chip*, 2015, 15(14): 2928-2938.
- [48] LIPP C, UNING K, COTTET J, MIGLIOZZI D, BERTSCH A, RENAUD P. *Lab Chip*, 2021, 21(19): 3686-3694.
- [49] WU Y, ZHAO L, CHANG Y, ZHAO L, GUO G, WANG X. *Chin. Chem. Lett.*, 2021, 32(11): 3446-3449.
- [50] OSADA K, HOSOKAWA M, YOSHINO T, TANAKA T. *Analyst*, 2014, 139(2): 425-430.
- [51] WANG C, LIU W, WEI Q, REN L, TAN M, YU Y. *Biomicrofluidics*, 2018, 12(3): 034103.
- [52] DI CARLO D, WU L Y, LEE L P. *Lab Chip*, 2006, 6(11): 1445-1449.
- [53] CHEN Y, AUSTIN R H, STURM J C. *Biomicrofluidics*, 2017, 11(5): 054107.
- [54] YESILKOY F, UENO R, DESBIOLLES B X E, GRISI M, SAKAI Y, KIM B J, BRUGGER J. *Biomicrofluidics*, 2016, 10(1): 014120.
- [55] CHEN H, SUN J, WOLVETANG E, COOPER-WHITE J. *Lab Chip*, 2015, 15(4): 1072-1083.
- [56] ZHU J, WANG Y, CHEN P, SU H, DU W, LIU B F. *Sens. Actuators, B*, 2019, 283: 685-692.
- [57] GANGULY R, LEE B, KANG S, KIM Y S, JEONG S G, KIM J S, PARK S Y, YOHEI Y, LEE C S. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 2021, 26(2): 179-187.
- [58] KOBEL S, VALERO A, LATT J, RENAUD P, LUTOLF M. *Lab Chip*, 2010, 10(7): 857-863.
- [59] SAUZADE M, BROUZES E. *Lab Chip*, 2017, 17(13): 2186-2192.
- [60] LI L, WANG H, HUANG L, MICHAEL S A, HUANG W, WU H. *Anal. Chem.*, 2019, 91(24): 15908-15914.
- [61] SUN X, LI B, LI W, REN X, SU N, LI R, LI J, HUANG Q. *Micromachines*, 2022, 13(8): 1272.
- [62] TANG X, LIU X, LI P, LIU F, KOJIMA M, HUANG Q, ARAI T. *Anal. Chem.*, 2020, 92(17): 11607-11616.
- [63] HE C K, CHEN Y W, WANG S H, HSU C H. *Lab Chip*, 2019, 19(8): 1370-1377.
- [64] CHUNG K, RIVET C A, KEMP M L, LU H. *Anal. Chem.*, 2011, 83(18): 7044-7052.
- [65] LIU Y, REN D, LING X, LIANG W, LI J, YOU Z, YALIKUN Y, TANAKA Y. *Sensors*, 2018, 18(11): 3672.

Advances in Microfluidic Chip Structures Based on Hydrodynamics of Efficient Single-Cell Capture

PAN Ting¹, WU Yuan-Yuan^{*1}, GUO Guang-Sheng^{1,2}, WANG Xia-Yan^{*1}

¹(Department of Chemistry, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

²(Institute of National Security, Minzu University of China, Beijing 100081, China)

Abstract Single-cell analysis is important for early diagnosis and treatment of major diseases, drug screening, and studying physiopathological processes. Microfluidic chips are capable of precisely controlling the microenvironment of single cells and monitoring their behavior in real-time, and have become a powerful tool for single-cell analysis. Single-cell capture is an important step in single-cell analysis. Till now, several microfluidic-chip-based single-cell capture methods have been reported, among which hydrodynamic microfluidic-chip-based single-cell capture has the advantages such as easy operation and high-efficiency of single-cell capture, and thus has received wide attention and has been used by researchers. To comprehensively understand the research status of hydrodynamic microfluidic-chip-based single-cell capture, master the structural design of high-efficiency single-cell capture microfluidic chips, and realize the accurate and rapid analysis of single cells, in this paper, the principle of efficient single-cell capture based on hydrodynamics and the structure of microfluidic chips are reviewed. There are three types of structures according to the structural design including micro-well structures, microcolumn structures and bypass channel structures. The optimization process of single-cell capture microfluidic chips is introduced. The materials, structural features, and single-cell capture efficiency of microfluidic chips are summarized, and the advantages and shortcomings of each single-cell capture structure are analyzed. Finally, the development trend of the hydrodynamic-based microfluidic chip single-cell capture method is prospected.

Keywords Single-cell; Hydrodynamics; Microfluidic chip; Capture; Review

(Received 2023-01-08; accepted 2023-02-22)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 22127805, 22176230), the Beijing Outstanding Young Scientist Program (No. BJJWZYJH01201910005017) and the China Postdoctoral Science Foundation (No. 2022M710277).