

学校编码: 10384

分类号_____密级

学 号: 20120051302014

UDC

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

细胞培养芯片的研制及芯片内骨髓间充质
干细胞分化控制的前期研究

The Fabrication of Cell culture chip and Pilot study of
Mesenchymal Stem Cells differentiation on-chip

李玲巧

指导教师姓名: 彭兴跃 副教授

专业名称: 水生生物学

论文提交日期: 2009年08月

论文答辩时间: 2009年09月

学位授予日期: 2009年 月

答辩委员会主席: 高亚辉 教授

评 阅 人: _____

2009年09月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

中文摘要	1
英文摘要	2
第一章 绪论	3
1.1 引言	3
1.2 微全分析系统的概述	4
1.3 微流控芯片的制作	5
1.4 微流控芯片的应用	11
1.5 微流控芯片在细胞学研究中的应用	13
1.6 骨髓间充质干细胞的分化研究	16
1.7 论文思路与设想	18
第二章 微流控芯片的研制	19
2.1 引言	19
2.2 实验材料、仪器及试剂	19
2.3 实验方法	20
2.3.1 玻璃-玻璃的制作步骤	20
2.3.2 玻璃-PDMS 芯片的加工	23
2.4 结果与讨论	24
2.4.1 芯片的设计	24
2.4.2 玻璃-玻璃芯片的制作	24
2.4.3 玻璃-PDMS 芯片的制作	29
第三章 细胞培养微系统的构建与应用	31
3.1 引言	31
3.2 实验仪器、材料及试剂	31
3.3 实验方法	32
3.3.1 细胞培养微流控系统的构建	32
3.3.2 芯片内流体速率测试	33
3.3.3 芯片内细胞的培养观察	33
3.4 结果与讨论	34
3.4.1 细胞的进样	34
3.4.2 芯片内流体速率测试	34
3.4.3 酵母细胞在芯片内的分选	34
3.4.4 骨髓细胞和塔玛亚历山大藻在芯片内的分选	36
3.4.5 芯片内骨髓细胞培养观察	36
3.4.6 塔玛亚历山大藻在芯片内的培养观察	37
第四章 兔骨髓间充质干细胞体外培养与定向诱导分化	39
4.1 引言	39
4.2 实验材料、试剂及仪器	39
4.3 实验方法	41
4.3.1 兔骨髓间充质干细胞的体外分离与原代培养	41
4.3.2 兔骨髓间充质干细胞的传代培养	41
4.3.3 兔骨髓间充质干细胞向成骨细胞的分化	41

4.3.4 兔骨髓间充质肝细胞向脂肪细胞的分化	42
4.4 实验结果	43
4.4.1 兔骨髓间充质干细胞的原代培养	43
4.4.2 兔骨髓间充质干细胞的传代培养	44
4.4.3 兔骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化	45
4.4.4 兔骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化	46
4.5 讨论	47
第五章 骨髓间充质干细胞在芯片内的培养	50
5.1 引言	50
5.2 实验材料、试剂及仪器	50
5.3 实验方法	50
5.3.1 骨髓间充质干细胞在芯片内的培养观察	50
5.4 结果与讨论	51
第六章 总结与展望	52
参考文献	54
致谢	60
研究生期间发表的论文	61

Abstract

Chinese abstract	1
English abstract	2
1 Introduction	3
1.1 Foreword.....	3
1.2 Overview of miniaturized total analysis systems	4
1.3 Fabrication of microfluidic chip	5
1.4 Applications of microfluidic chip	11
1.5 Applications of microfluidic chip in cytology research	13
1.6 Differentiation research on Mesenchymal Stem Cells.....	16
1.7 The aim of this thesis	18
2 The Fabrication of microfluidic chip	19
2.1 Introduction	19
2.2 Materials	19
2.3 Methods	20
2.3.1 Fabrication process of glass-glass chip	20
2.3.2 Fabrication process of glass-PDMS chip.....	23
2.4 Results and discussion	24
2.4.1 Design of chip	24
2.4.2 Fabrication of glass-glass chip	24
2.4.3 Fabrication of glass-PDMS chip.....	29
3 Manufactures and applications of cell culture chip system	31
3.1 Introduction	31
3.2 Materials	31
3.3 Methods	32
3.3.1 Manufacture and application of cell culture chip system.....	32
3.3.2 Test of fluid velocity in chip.....	33
3.3.3 Cultures and observations of cells in chip.....	33
3.4 Results and discussion	34
3.4.1 Cell injection	34
3.4.2 Test of fluid velocity on-chip	34
3.4.3 Selection of yeast cells on-chip.....	34
3.4.4 Selection of cells from bone marrow and algal cells in chip.....	36
3.4.5 Cultures of cells from bone marrow in chip.....	36
3.4.6 Cultures of algal cells in chip.....	37
4 Cell culture and differentiation of Mesenchymal Stem Cells	39
4.1 Introduction	39
4.2 Materials	39
4.3 Methods	41

4.3.1 Separation and primary cultures of Mesenchymal Stem Cells.....	41
4.3.2 Passage cultures of Mesenchymal Stem Cells.....	41
4.3.3 Mesenchymal Stem Cells differentiate into osteoblasts.....	41
4.3.4 Mesenchymal Stem Cells differentiate into adipocytes.....	42
4.4 Results	43
4.4.1 Primary cultures of Mesenchymal Stem Cells.....	43
4.4.2 Passage cultures of Mesenchymal Stem Cells.....	44
4.4.3 Mesenchymal Stem Cells differentiate into osteoblasts.....	45
4.4.4 Mesenchymal Stem Cells differentiate into adipocytes.....	46
4.5 Discussion	47
5 On-chip culture of Mesenchymal Stem Cells	50
5.1 Introduction.....	50
5.2 Materials.....	50
5.3 Methods.....	50
5.3.1 On-chip culture of Mesenchymal Stem Cells.....	50
5.4 Results and discussion.....	51
6 Summary and outlook	52
7 References	54
8 Acknowledgements	60
9 Publications	61

中文摘要

微全分析系统(Miniaturized Total Analysis Systems, 简称 μ TAS)作为一门多学科交叉的研究领域,越来越受到重视,作为其中之一的微流控芯片,由于具有传统细胞培养无可比拟的优势,成为近年来快速发展的热门方向。

本论文初步建立了芯片的设计制作工艺和温度压力控制方法及进样技术。成功制作了玻璃-玻璃、玻璃-PDMS 不同材料的芯片并测试了各种芯片的性能。制作成功的芯片对各种细胞有很好的保留作用,有利于细胞的固定和培养。作为芯片应用的初步研究,本文选择兔骨髓间充质干细胞作为研究对象,进行了成骨和成脂分化的前期研究,并在玻璃芯片上进行了干细胞的培养实验。

本论文主要工作如下:

1.成功制作了一种能很好保留细胞的芯片,这种芯片能使流体速率在大范围里呈对数衰减,从而控制细胞停留在不同的位置。

2.利用标准光刻技术、湿法腐蚀、高温键合等技术,探索了微流控细胞芯片的制作,结合温度等控制装置和实时拍摄系统,实现微流控芯片系统在细胞保留及培养中的实用化。

3.体外培养兔骨髓间充质干细胞,研究骨髓间充质干细胞在体外向成骨细胞和脂肪细胞的分化过程,为进一步在芯片上控制细胞分化提供了很好的对比材料和根据。

4.在芯片上初步进行了干细胞的生长研究,为干细胞在芯片上进行分化研究提供了很好的技术基础。

本论文研究表明,细胞芯片系统能在体外培养细胞,并可对培养过程实时观察和记录。但是要在芯片内长期培养细胞还需摸索一些实验影响因素和条件。

关键词: 微流控芯片; 骨髓间充质干细胞; 细胞培养; 细胞分化。

Abstract

Miniaturized Total Analysis Systems (μ TAS) is becoming more and more important as an interdisciplinary technique. Due to its advantages, microfluidic chip has been applied in cytological researches in recent years.

In this dissertation, the fabrication technique of different kinds of microchips has been studied, including chip design, glass etching, glass bonding, temperature control and sample injection. We tried materials of both glass and Polydimethylsiloxane (PDMS) for glass-glass and glass-PDMS microchip fabrication. These chips can successfully retain cells for cell cultures. In our experiment, mesenchymal stem cells (MSCs) are used for the test of on-chip stem cell differentiation.

Detailed results of this research are concluded as below.

1. Microchips of glass or glass-PDMS or PDMS were successfully fabricated using standard photolithography, wet etching and high-temperature bonding techniques. The temperature was precisely controlled for on-chip cell cultures.

2. A large-scale logarithmic flow-rate damping microchip was proved efficient for cell retaining of different adherence.

3. MSCs were cultured for osteogenic and adipogenic differentiation details. These cell differentiation details provided useful background or comparable data for further on-chip cell differentiation studies.

4. On-chips MSCs culture was achieved as a preliminary study. Cells on chips were able to proliferate. This on-chip cell culture technique provide a useful platform for on-chip cell studies.

Our research idicated that cells can relive on chip ,and it can be observed by microscope camera system simultaneity.However,some experiment conditions must to be research if cells culture on chip long time.

Keywords: microfluidic chip; mesenchymal stem cells; cell cluture; cell differentiation.

第一章 绪论

1.1 引言

细胞是生命体结构和功能的基本单位,任何生命现象的本质都要从细胞水平上来阐述。为了掌握生命过程的规律,必须以研究细胞为基础,深入探索细胞的行为。随着对细胞研究的不断深入,已经从细胞群、细胞整体、亚细胞结构深入到分子结构,从细胞内各组分分析深入到对细胞呼吸作用、光合作用、信息传递、跨膜运输等生命活动的研究,传统的细胞分析仪器已不能满足对细胞研究的需求,而新型的细胞分析仪器、分析技术不断涌现,其中,微流控芯片以其独有的优势在细胞分析中起着越来越重要的作用^[1]。

传统的细胞培养消耗培养基多,培养器皿多为一次性使用,消耗资源多;不能精确控制细胞的微环境,很难模拟细胞在体内的真实情况,只能对细胞群体进行分析获得细胞中的化学信息。而且通过细胞群体分析获得的统计平均结果,掩盖了单个细胞之间的差异,并且不能无间断的拍摄记录细胞的生长情况。而将微流控芯片应用于细胞培养中,能较好地解决这些问题^[1]。

(1)微流控芯片的通道直径通常在 $10\sim 100\mu\text{m}$,与单个生物细胞在尺度上具有相容性,并且通道内不断流动的介质能为细胞提供所需物质和微环境。

(2)微流控芯片具有网络式二维或三维通道,非常容易操纵单细胞尺度的目标物。在微流控系统中有多种操纵细胞的方法,能操纵细胞停在任意通道内任意的位置,方便细胞的观察和后续研究。

(3)微流控芯片为平板式几何构型,制作所选材料一般都光学性能比较好,能与图像拍摄系统结合,进行更好的动态拍摄和检测。

(4)在微流控系统上比较容易集成各种标准分析操作。

(5)微流控芯片可以同时准确的对细胞施加多种影响或者减少某些因素的存在,更好的控制细胞生长的微环境,进行更精细的实验。

(6)微流控芯片设计、制作简单,可以根据实验需要设计所需的芯片模型。因此,微流控芯片技术在细胞研究领域,将有着有着十分重要的意义和广阔的前景。

1.2 微全分析系统的概述

微全分析系统(Miniaturized Total Analysis Systems,简称 μ TAS)的概念是在1990年首次由瑞士Giba-Geigy公司的Manz和Widmer提出^[2]。从二十世纪末至现在不到二十年的时间里,微全分析系统(μ TAS)已经从一个概念发展成为在化学和生物科学广泛应用的技术领域^[3-6],它跨越多个学科,其目标是通过分析化学、微机电加工(Micro Electro-Mechanical System,简称MEMS)、计算机、电子学、材料学及生物学、医学的交叉,最大限度地把化学分析检测的过程浓缩到只有几个厘米大小的微小芯片上,实现分析实验室的“微型化”、“个人化”和“家用化”。因此微全分析系统也被称作“芯片实验室”(LOC,即lab on a chip)或简称芯片实验室(Lab chip)。

当前的微分析系统可分为芯片式与非芯片式两大类。目前芯片式是发展重点,根据应用领域可以分为生物芯片和化学芯片两大类,依据芯片结构及工作原理又可分为微阵列(生物)芯片和微流控芯片和微悬浮芯片(图1.1)^[7]。其中,微悬浮芯片技术是从流式细胞技术发展起来的,在液相中完成亲和反应与快速检测的一种新型芯片技术,主要应用于核酸、蛋白质等生物分子的分析。相比之下,微阵列芯片和微流控芯片是发展更早,应用更广泛的两种技术。

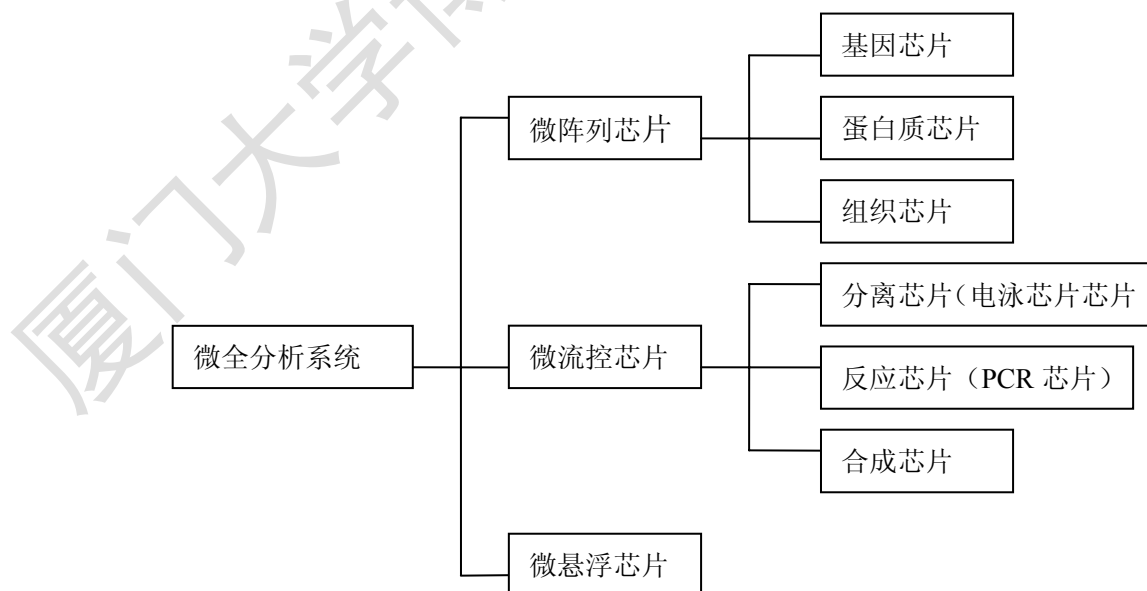


图 1.1 微全分析系统的分类

Fig1.1 The classify of Miniaturized Total Analysis Systems

微阵列芯片^[8-9] (Mircoarray Chip) 发展于上个世纪 80 年代末, 它是指通过平面微细加工技术在固体芯片(如硅片、玻璃片、聚丙烯或尼龙膜等)表面构建的阵列式的微分析单元, 以实现细胞、蛋白、核酸以及其他生物组分的准确、快捷、大信息量的检测。简言之, 微阵列芯片是一种以微点阵列为结构特征, 以生物亲和反应为基础的技术, 又被称为“生物亲和芯片”, 由于具有高通量、平行化、自动化等优点, 微阵列芯片在生物、检疫、制药等领域获得广泛的应用。

微流控芯片^[10] (Microfluidic Chip) 则涉及分析化学、计算机、微机电加工 (MEMS)、电子学、材料科学、生物学及医学等多个学科, 以微管道网络为结构特征, 它把整个化验室的功能, 包括采样、稀释、加试剂、反应、分离、检测等集成在微芯片上, 且可多次使用, 因此具有更广泛的适用性^[7]。微流控芯片根据使用目的或功能不同又可分为分离芯片(如电泳芯片)、反应芯片(如 PCR 芯片)和合成芯片等。

微芯片分析系统的出现不仅可使珍贵的生物试样与试剂消耗大大降低到微升甚至纳升级, 而且使分析速度成十倍百倍地提高, 费用成十倍百倍地下降。因此, 成本低、耗样品量少、快速灵敏、便于集成与携带等优点, 使微流控芯片系统在分子与材料合成、细胞学研究、环境监测、医学、食品卫生等方面有望成为重要的应用领域^[4,11]。

1.3 微流控芯片的制作

1.3.1 微流控芯片的材料

微流控芯片的制作材料主要有: 玻璃、石英以及聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA)、聚二甲基硅氧烷 (PDMS)、聚碳酸酯 (PC) 等高分子聚合物。

1.3.2.1 硅与二氧化硅

在微流控芯片发展的初期, 由于制备工艺沿用微电子技术进行加工, 主要使硅作为芯片材料。硅有良好化学惰性和热稳定性, 生产工艺成熟, 可使用光刻技术高精度地复制二维图形和复杂的三维结构, 但由于硅易碎、价格贵、不透光、绝缘性能较差, 表面化学行为复杂, 这些缺点限制了它在微流控芯片中的广泛应用。

1.3.2.2 玻璃和石英

玻璃和石英有很好的电渗性质和良好的光学性质, 而且它们的表面性质, 如

湿润能力、表面吸附和表面反应性等，都有利于使用不同的化学方法对其进行表面改性。使用光刻和蚀刻技术可以将微通道网络刻在玻璃和石英上，因此玻璃和石英成为应用最广泛的微流控芯片材料。

1.3.2.3 高分子聚合物

另外，以PMMA和PDMS为代表的高聚物因其光学性质好、易加工成型、表面易修饰改性、材料成本与加工成本低，适合于大批量制作一次性微流控芯片。近年来引起人们广泛的关注，并逐渐成为除玻璃外的另一类主要芯片材料。

1.3.2 微流控芯片的制作方法

微流控芯片的制作基本可分为微通道加工和键合两部分。微流控分析芯片最基本的结构特征是微米至亚毫米级的微通道系统。在此尺度下一般的机械加工手段难以满足要求，因此需要与之相配的微加工手段。目前，在微电子技术中发展并完善的光刻技术在微流控芯片加工中仍占有中心和基础地位，其核心是微结构图形的转移。其他几种微通道加工方法有激光烧蚀法、热压法、浇铸成型法、注塑法。

1.3.2.1 玻璃微流控芯片的制作方法

玻璃微流控芯片的常用制作方法是采用标准光刻技术^[12]、湿法刻蚀和高温键合的方法(如图 1.2)，基本步骤如下^[13]：

(1)刻蚀保护层的获得(见图 1.2 A,B)

在干净的玻璃表面生长一层金属薄膜作为牺牲层^[14]。常用的是磁控溅射金属铬。在金属层上均匀涂覆一定厚度的光刻胶，光刻胶的实际厚度与它的粘度有关，并与甩胶机的旋转速度的平方根成反比。

光刻胶是一种光敏高分子聚合物，分为正光刻胶和负光刻胶两种，当光照射时负光刻胶时，光刻胶主要发生交联反应，相邻的聚合物链之间产生化学键，在整个辐照区形成一个大分子。曝光过的负光胶，由于分子量变大而使得溶解度降低，成为非溶性，没有曝光过的负光胶，由于没有发生交联反应，在显影时被溶掉。当光照射正光刻胶时，降解反应占主导地位，光胶大分子分裂成小分子。在显影时，曝光过的正光胶由于分子量变小而使得溶解度增大而被显影液溶去，未照射到的部分显影后依然保持不变。

(2)曝光(见图 1.2 C)

制备光掩膜，将具有微通道的光掩模板覆盖在基片上，紫外光照射使光刻胶曝光。曝光时间由光刻胶种类、胶层厚度、光源强度，以及光源与基片间距共同决定，一般从几秒到几十秒不等。

(3)显影(见图 1.2 D)

如果涂覆的是正胶，用显影液去除在曝光部分的光刻胶，如果是涂覆的是负胶，则曝光部分被保留，得到与掩膜相同（正胶）或相反（负胶）的图案。显影时间因光刻胶种类、胶层厚度、显影液种类、显影温度 and 操作方法而异。

(4)Cr 层开窗口(见图 1.2 E)

利用未曝光的光胶的保护作用，用去铬液(一般为硝酸饰铵和高氯酸混合溶液)可除去玻璃表面的铬层

(5)湿法刻蚀(见图 1.2 F)

湿法刻蚀即所用的刻蚀剂为水溶液，一般用含氢氟酸的溶液，在玻璃上刻蚀所需的通道。刻蚀速率与玻璃的硬度、刻蚀剂的温度、浓度、搅拌程度等因素会影响有关，通过控制刻蚀时间可控制刻蚀深度。

除了基于光刻的湿法腐蚀工艺外，玻璃微结构的加工还可以采用干法腐蚀，干法刻蚀的刻蚀剂是等离子体，在等离子体中，游离基的化学性质十分活泼，利用它和被刻蚀材料之间的化学反应，达到刻蚀的目的。包括等离子刻蚀（Plasma Etching）、反应离子刻蚀(Reactive Ion Etching,简称 RIE)以及激光烧蚀（Laser Ablation）等微加工技术。

(6)去除光刻胶 (见图 1.2 G)

用有机溶剂可以溶解光刻胶，例如丙酮、酒精等。

(7)去除金属层(见图 1.2 H)

用去铬液(一般为硝酸饰铵和高氯酸混合溶液)可除去玻璃表面的铬层。

(8)玻璃键合

通常使用高温键合^[15],也有使用常温键合^[16]、阳极键合^[17]、粘结剂^[18]、化学活化键合等方法进行键合的报道。

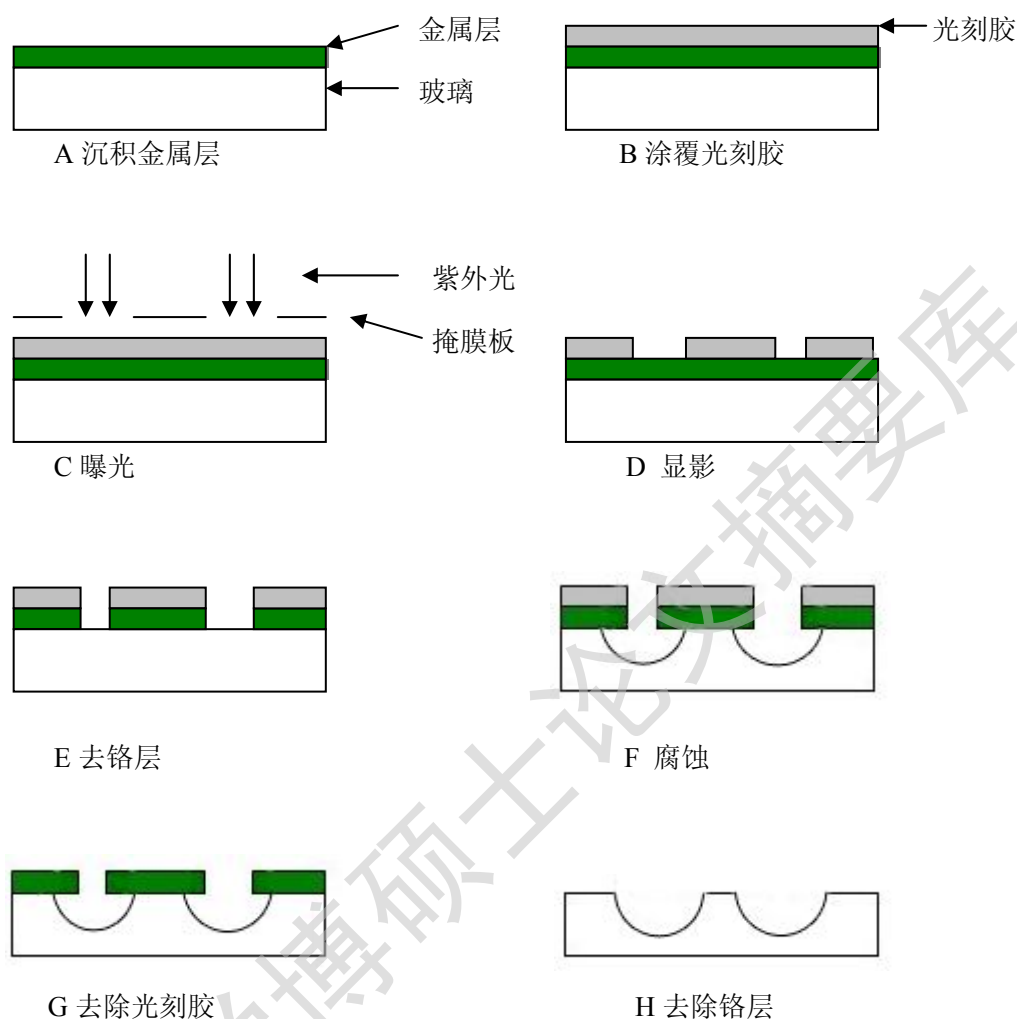


图 1.2 湿法腐蚀制作玻璃芯片的工艺流程图

Fig1.2 The manufacturing process of glass chip by wet etching

1.3.2.2 高聚物微流控芯片的制作

PMMA和PDMS是目前应用于微流控芯片的最常见高聚物材料^[19-20]。对比玻璃芯片的加工，高聚物芯片的制作方法种类繁多，主要有热压法、注塑法、浇铸成型法。

1.3.2.2.1 激光烧蚀法(Laser Ablation)

激光烧蚀法^[21-22]是一种非接触式的直写微细加工技术，利用激光的高能量可在高聚物表面直接烧蚀出微结构。它直接根据计算机CAD等绘图软件设计图形，在高聚物材料上加工不同形状和尺寸的微孔和微通道。该方法不需要掩模板，步骤简单，加工速度快，不需要超净环境，在实验中得到广泛运用。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库