



COP-PDMS微流控芯片的制备及在太赫兹对肠道上皮细胞生物效应中的应用

王澄瑶 李旭 卢晓云

Fabrication of cyclic olefin polymer and polydimethylsiloxane co-bonded microfluidic device and its applications in terahertz biological effects on intestinal cells

Wang Cheng-Yao Li Xu Lu Xiao-Yun

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 70, 248706 (2021) DOI: 10.7498/aps.70.20211807

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.70.20211807>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

专题: 太赫兹生物物理

COP-PDMS 微流控芯片的制备及在太赫兹对肠道上皮细胞生物效应中的应用*

王澄瑶¹⁾ 李旭²⁾ 卢晓云^{1)2)†}

1) (西安交通大学, 瞬态电磁环境与应用国际联合研究中心 西安 710049)

2) (西安交通大学生命科学与技术学院, 线粒体生物医学研究所, 生物医学信息工程教育部重点实验室, 西安 710049)

(2021 年 9 月 28 日收到; 2021 年 11 月 22 日收到修改稿)

用于细胞培养的常规培养皿无法直接用于激光共聚焦显微镜的观察, 在很大程度上限制了细胞水平上的太赫兹生物效应研究的开展. 本文采用了对太赫兹吸收率低的材料——环烯烃聚合物 (COP), 与聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 进行共键合, 借用软蚀刻、光刻、等离子清洗和高温高压孵育技术将两种材料整合成新型微流控芯片, 并利用该微流控芯片探索太赫兹对肠道细胞的生物效应. 该微流控芯片可实现肠上皮细胞 Caco-2 的动态培养, 原位免疫荧光染色及激光共聚焦显微镜的直接观察, 为太赫兹细胞水平的生物效应研究提供了高效便捷的实验环境. 研究中将微流控芯片中培养的肠上皮细胞 Caco-2 经 15 mW/cm^2 的 0.1 THz 波辐照 10 min , 免疫荧光染色结果显示细胞贴附生长的形态改变, 胞间紧密连接蛋白 ZO-1 及桩蛋白 Paxillin 的水平及分布发生变化, 提示太赫兹对细胞的胞外连接及胞间连接均可产生影响, 可减弱细胞与培养界面的黏附. 本研究设计制备的 COP-PDMS 共键合微流控芯片为探索太赫兹对细胞的生物效应提供了便捷有效的平台, 有望在未来进一步用于太赫兹对细胞分子效应的实时研究.

关键词: 环烯烃聚合物, 微流控, 太赫兹生物效应

PACS: 87.50.up, 81.05.-t, 87.85.Ox

DOI: 10.7498/aps.70.20211807

1 引言

太赫兹 (terahertz, THz) 是介于电子学和光子学之间的一个特殊波段, 其波段的频率范围与生物分子骨架的振动和旋转频率相当^[1], 辐射能级与生物分子间的弱相互作用的能级较为一致^[2]. 因此, 目前认为太赫兹波在生物医学领域中具备一些其他频段电磁波所不可替代的优势. 除了目前已大量开展的太赫兹时域光谱对生物分子特征指纹的鉴定及生物组织成像之外^[3], 太赫兹的生物效应研究也成为太赫兹技术应用研究的热点领域. 研究发现, 太赫兹对细胞基因表达、细胞膜功能、生物分子

相互作用均产生一定程度的作用, 提示了太赫兹可在分子细胞水平上对生命活动的多个方面产生影响^[4], 如太赫兹辐射能够促进细胞微丝蛋白 Actin 的聚合^[5], 太赫兹破坏皮肤组织的同时增加了抑制肿瘤的蛋白质^[6], 以及太赫兹可造成神经元膜屏障特性的可逆破坏, 从而使得对化合物的通透性增加^[7].

然而, 目前研究太赫兹在细胞水平上的生物效应研究的局限性在于难以进行对细胞或分子样品的实时同步观察或检测. 目前用于细胞培养的培养皿的主要材料为聚苯乙烯 (polystyrene, PS), 如需进行激光共聚焦显微镜观察, 则通常采用底部为石英材质的培养皿或制备细胞爬片来进行, 这两种材料特别是石英被报道在 $0.5\text{--}2.5 \text{ THz}$ 波段下对太

* 国家自然科学基金委员会-中国工程物理研究院联合基金 (批准号: U2030105) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: luxy05@xjtu.edu.cn

赫兹的吸收率较高^[8–10], 难以将细胞直接培养进行太赫兹辐照并实现激光共聚焦显微镜的观察. 一款新材料——环烯烃聚合物 (cyclic olefin polymer, COP) 的出现或可解决太赫兹在传输到细胞过程中被吸收的问题, 该材料对太赫兹的吸收低于其他常规用于细胞培养的材料^[9,11,12]. 本文利用 COP 在 0.5—2.5 THz 波段下对太赫兹吸收率低的特点, 结合微流控技术的灵活性和可设计性, 将 COP 用于适合太赫兹细胞效应研究的微流控芯片的制备中. 而用于常规微流控芯片制作的聚甲基丙烯酸甲酯 (poly(methylmethacrylate), PMMA)、聚对苯二甲酸乙二醇酯 (polyethylene terephthalate, PET)、聚碳酸酯 (polycarbonate, PC), 以及聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 等材料中, 因 PDMS 具有出色的可塑性, 其在软蚀刻和光刻中的多次复制沟道技术中应用极广. 与 PMMA, PET 和 PC 相比, PDMS 具有较低的太赫兹的吸收率^[8,11,13], 但其对太赫兹的吸收率在 0.5 THz 波段下仍高于 4.5 cm^{-1} ^[8]. 本文将 PDMS 和 COP 结合起来, 利用 PDMS 在沟道复制中的优势以及 COP 对太赫兹的低吸收率的特性, 设计并制备了 COP-PDMS 微流控芯片模型, 并利用微流控芯片探索了太赫兹对肠道上皮细胞的生物效应, 实现了基于 COP-PDMS 微流控芯片的细胞培养、太赫兹辐照干预和激光共聚焦检测的一体化.

2 研究方法

2.1 太赫兹吸收率检测

采用太赫兹三维层析成像系统 (QT-TO1000) 基于太赫兹时域光谱探测 COP 和 PDMS 样片的透射信号. 通过调节该系统中器件的相对位置将光路调节至最佳状态, 将待测样片放置于太赫兹光路聚焦光斑位置, 扫描样品置于聚焦光路中的太赫兹透射信号作为样品测试信号. 参考信号为无样品时的太赫兹透射信号. 其中, COP 和 PDMS 样片的厚度均为 1.6 mm.

2.2 微流控芯片设计及制作

在前期微流控芯片设计工作的基础上^[14,15], 优化本 COP-PDMS 微流控芯片中单个芯片模块的设计参数为: $2.6 \text{ cm} \times 1.5 \text{ cm} \times 0.1 \text{ cm}$ (长 \times 宽 \times 高)(图 A1). 模具制作和重复倒模过程如图 1 所示, 具体步骤如下: 设计的微流控沟道采用软蚀刻技术通过光刻模式形成以 SU-8 光刻胶和硅片为基底的圆形阵列式模具, 采用含有机硅和固化剂的 SYLGARD 184 硅胶套件 (Dow Chemical, USA) 制备 PDMS 器件. 有机硅和固化剂按 9:1 的比例混合, 倒入模具, 将模具放置在真空脱气室中 (Bell-Art Products, USA) 过夜以清除混合后液体 PDMS

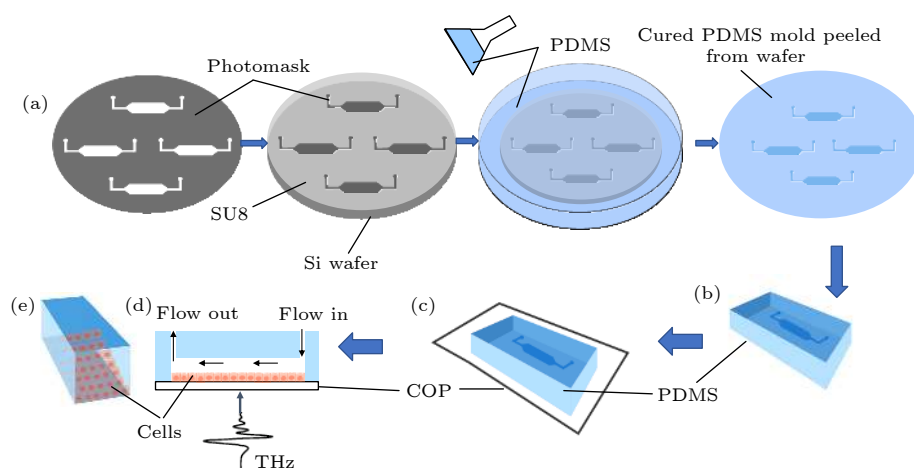


图 1 COP-PDMS 共键合微流控芯片倒模制作图例 (a) 通过光刻技术形成以 SU-8 和硅片为基底的圆形微流控芯片阵列式模具; (b) 切割后的单个微流控芯片模块; (c) PDMS 模块与 COP 板材通过等离子处理后键合; (d) 在形成的 COP-PDMS 微流控沟道中进行动态细胞培养的侧面图; (e) 含有细胞的微流控沟道的三维图

Fig. 1. Schematic fabrication process of COP-PDMS co-bonded microfluidic device: (a) Using soft lithography technology to prepare the round microfluidic device array mold on the SU-8 and silicon wafer; (b) the single microfluidic device module; (c) the PDMS module and COP plate are fabricated by plasma treatment; (d) side view of cells dynamically cultured in the COP-PDMS microfluidic channel; (e) three-dimensional view of microfluidic channels containing cells.

中的空气,再放入 80 °C 的烘箱中烘烤 6 h 固化成型. PDMS 模块固化后,用打孔器切割出 0.75 mm 的孔径作为微流控通道的进出口并连接连接管. 微流控连接管的尺寸为内径 0.25 mm,外径 0.75 mm.

2.3 COP-PDMS 键合

采用的 COP 板材由 COP 颗粒压制而成,通过上述 2.1 节中的方法在实验室加工 PDMS,两种材料的厚度均为 1.6 mm. 由于 COP 和 PDMS 材料表面的疏水性,两种材料无法在表面未处理的情况下进行键合,因此有必要对 COP 和 PDMS 表面进行化学基团修饰. 利用等离子体清洗机 (PLUTO-T) 处理引入极性基团, COP 表面的化学键由疏水性 (C—H 键) 变为亲水性 (C—OH, C—NH, —COOH 键); 而 PDMS 由重复的—O—Si(CH₃)₂—基团组成,极性基团,如硅醇基团 (Si—OH), 通过将 PDMS 块暴露在空气等离子体中引入. 因此,当含有这些极性基团的 COP 和 PDMS 表面接触时,两种材料表面产生脱水反应后形成化学键,可以被紧密黏合密封. 根据已经报道的 COP 以及 PDMS 键合的条件 [14–16], 本文中等离子处理条件为: 真空度 0.024 kPa, 空气流量参数为 180 mL/min, 发射功率 150 W, 时间 60 s, COP 与 PDMS 黏合后的烘烤温度为 80 °C, 烘烤时长为 6 h.

2.4 键合强度测试

在采用已报道的键合条件进行 COP-PDMS 键合后,由于其键合强度无法满足本研究中所模拟不同器官内流体剪切应力所需的高灌注流量,因此,对 COP-PDMS 的键合方式进行进一步改良,在高温烘烤过程中通过添加重物给 COP-PDMS 表面以添加不同的压强 (0, 125, 250, 750, 1000, 1250, 2500, 3750 和 5000 Pa), 加压的原因是为了应对 COP 板与 PDMS 模块的表面不平整而造成二者键合不牢固,由于 PDMS 的硬度不高且具有弹性,加压后可使得 COP 与 PDMS 的接触面增大,从而抵消了板子不平整而产生的键合不牢固的问题. 在键合完成后通过推拉力计测试 COP 和 PDMS 的键合强度,即通过侧面推拉的方式完全剥离两种材料所需的剪切应力

$$\tau_m = \frac{F}{A}, \quad (1)$$

其中 F 是推拉力计的输出数据, A 为微流控芯片单个

模块的面积,推拉力计的输出速度控制为 0.2 mm/s.

2.5 生物流体剪切应力对应的微流控灌注流量计算

为计算在微流控芯片中模拟与生物体内一样水平的流体剪切应力所需的灌注流量,假设在微流控沟道中的液体为牛顿液体,流动方式为层流,重力影响忽略不计,流体剪切应力计算方式如下:

$$\tau_1 = \mu \frac{\partial v}{\partial y}, \quad (2)$$

其中 τ_1 为生物各个组织器官中的流体剪切应力; μ 为牛顿液体动态黏性系数,常温下,水的动态黏性系数为 8.90×10^{-3} dyne·s·cm⁻², 细胞培养基的动态黏性系数可认为约等于水; v 为流体速度; y 为层流距离底部边界高度.

通过对 (2) 式进行积分得到流体速度与流体剪切应力的关系为

$$v = \int_0^v dv = \int_0^h \frac{\tau_1}{\mu} dy = \frac{\tau_1}{\mu} h, \quad (3)$$

其中 h 为微流控芯片沟道高度. 在已知生物体各个器官的流体剪切应力的情况下,根据沟道的尺寸得出了在微流控系统对应的流量:

$$Q = v A_1 = \frac{\tau_1}{\mu} h A_1, \quad (4)$$

其中 Q 为微流控系统内的流体流量, A_1 为微流体沟道中流体流过的横截面面积.

2.6 细胞培养

本文以人肠上皮细胞 Caco-2 (ATCC, USA) 为模式细胞探索太赫兹辐射对细胞的生物效应. Caco-2 细胞在 75 cm² 细胞培养瓶中培养完成复苏和扩增,培养基为低糖 DMEM (HyClone, SH-30021.01), 含有 20% 胎牛血清 FBS (BI, 04-001-1A) 和 1% 的青霉素-链霉素 (Solarbio, P1400). 细胞在 37 °C 和 5% CO₂ 的湿润条件下孵育直至覆盖培养瓶表面 70%, 将细胞消化后接种至微流控芯片. 在细胞接种至微流控芯片之前,先对芯片进行清洁灭菌处理. 简单来说,先用 75% 酒精灌注微流控沟道和连接管进行清洁,在生物安全柜中用紫外灯灭菌后,用 50 µg/mL 人类成纤维细胞纤连蛋白 (Sigma-Aldrich, 33016015) 和 100 µg/mL 大鼠来源的鼠尾胶原蛋白 (Roche, 11179179001) 依次

对沟道表面进行包被. 使用细长低吸附移液枪头 (Rainin, 30389291) 将密度为 5×10^6 个/mL 的细胞悬液通过移液枪泵入到微流控沟道中, 在培养箱中静置 3 h 使得细胞贴附, 随后分为静态培养和动态培养. 静态培养中, 细胞贴附后每天进行换液; 动态培养中, 细胞贴附后使用注射泵 (DK Infusetek Co., ISPLab12) 以与肠上皮的生理管腔应力等等的流量 ($0.05 \mu\text{L/s}$ [17,18]) 向微流控沟道中灌注新鲜细胞培养基, 动态和静态均持续培养 4 天.

2.7 辐照条件

在植入细胞后的第二天开始对微流控芯片进行太赫兹辐照. 太赫兹发射源 (Terasense Sub-THz wave source, S/N: 200382) 放置于 COP-PDMS 芯片底部 1.5 cm 处. 采用 0.1 THz、实测平均功率密度为 15 mW/cm^2 的太赫兹波对微流控芯片进行辐照, 每天辐照 10 min, 连续辐照 3 天. 在最后一次辐照后继续培养 6 h, 再进行后续的细胞固定及免疫荧光染色.

2.8 免疫荧光染色

用 3.7% 多聚甲醛固定细胞 10 min 后, 用体积浓度为 0.1% 的 triton X100 (Solarbio, T8200) 在室温下渗透细胞 10 min. 用体积浓度为 5% 的牛血清白蛋白 (Bioforxx, 4240GR100) 覆盖芯片沟道, 并在室温下停留 30 min 以阻断非特异性蛋白的结合, 洗去牛血清蛋白后加入鬼笔环肽标记的染料 (Beyotime, C2207S) 对细胞骨架微丝蛋白 F-actin 进行染色, 孵育时间为 1 h. 随后加入 1:200 稀释的一抗 (细胞紧密连接蛋白 ZO-1 (ProteinTech, 66452-1-Ig) 或桩蛋白 Paxillin (ProteinTech, 10029-1-Ig)), 在 4°C 孵育过夜后加入 1:100 稀释的二抗 FITC (ProteinTech, SA00003-1), 在室温下孵育 1 h 后使用 DAPI 对细胞核进行染色. 免疫荧光染色完成后, 用共聚焦显微镜 (ZEISS LSM 700) 对细胞进行成像, 记录荧光强度和细胞核数, 通过 ImageJ 软件对每个细胞中相应种类蛋白的荧光强度进行定量分析.

2.9 数据分析

每个实验测试的重复次数为 $n \geq 3$. 数据采用平均值 \pm 均值标准误差 (SEM) 表示, 特定情况单

独说明, 实验组之间结果差异的显著性分析采用单因素方差分析和 t 检验. 为了避免统计上的出现 I 型和 II 型误差增加, 本文使用了 Bonferroni 校正和霍尔姆法. 统计分析通过 Microsoft Excel 和 Matlab 完成, p 值小于 0.05 时认为结果具有显著性差异.

3 结果与讨论

3.1 COP 和 PDMS 的太赫兹吸收率

通过对两种材料的太赫兹吸收率的检测发现, PDMS 对太赫兹的吸收系数在低频段时 (小于 1 THz) 随着太赫兹频段上升而增加, 而当太赫兹频率超过 1 THz 后, PDMS 的吸收系数出现最高峰: 约为 20 cm^{-1} (图 2). 不同于 PDMS 的吸收系数随着太赫兹频率变化而产生差异, 在太赫兹频段 0.1—2.4 THz 范围内, COP 的吸收系数维持在 $0.01\text{—}1 \text{ cm}^{-1}$ (图 2) 范围内. 该结果提示了 COP 对太赫兹的透过性高, 对比其他常用高分子材料如 PMMA, PET, PC, PS 和石英在该频段范围的吸收率 [8,10,12,19], COP 将会在未来太赫兹生物效应的研究中发挥巨大作用.

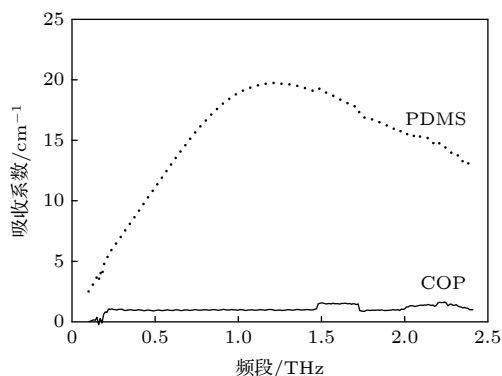


图 2 两种微流控材料——COP 和 PDMS 在太赫兹频段 0.1—2.4 THz 范围内的吸收光谱

Fig. 2. The THz absorption map of two characteristic materials: COP and PDMS, between the frequency from 0.1 to 2.4 THz.

3.2 COP 等离子改性

COP 表面改性结果显示, 经过等离子处理后, 该 COP 板材的表面被成功改性: 未经过改性的板材表面的超纯水液滴呈现球状, 等离子改性后, 超纯水液滴在板子表面张力减小, 呈现平铺状态 (图 A2), 提示了改性后的 COP 表面呈现亲水性.

PDMS 的等离子改性参数及结果在前期的工作中已经完成^[20]. COP 和 PDMS 表面均呈现亲水性, 代表了极性基团的成功引入, 理论上, 其表面进行脱水反应后产生的化学键可以使两种材料紧密黏合.

3.3 COP-PDMS 键合强度

通过推拉力计对 COP-PDMS 的键合强度进行检测后发现, 完全剥离 COP 和 PDMS 模块需要的剪切应力从 0.1 至 0.6 MPa 不等 (图 3(a)). 根据目前已发现的 PDMS 与其他材料的键合强度数据, PDMS 与石英的键合强度最大^[21], 为 0.33 MPa^[22] 至 0.497 MPa^[23,24]. COP-PDMS 键合强度的结果显示, 在外加压强 3750 和 5000 Pa 时, 对应的剪切应力分别为 0.51 MPa 和 0.56 MPa, 均高于 PDMS 与石英的键合强度, 证明了额外加压后, COP-PDMS 能够达到与 PDMS-石英同样甚至更高强度的键合效果. 该研究结果还显示, 不同加压条件下键合的

COP-PDMS 的强度与压强呈正相关关系 (图 3(b)). 在压强较低时 (低于 750 Pa), 加压与键合强度的正相关关系坡度较陡, 提示了在低压条件下, 加压对增加键合强度的效果更明显; 而加压高于 750 Pa 时, 加压与键合强度的正相关关系的坡度变缓, 这是缘于加压后 PDMS 与 COP 增加的接触面积有限且两种材料表面互相反应的极性基团的数量逐渐被饱和.

3.4 COP-PDMS 微流控芯片高灌注量和长时程检测

由于 PDMS-石英键合的微流控芯片的强度和密封性的优势, 其在体外细胞培养中应用广泛, 而在本研究中键合的 COP-PDMS 微流控芯片强度能够达到同样的水平, 为了验证该芯片同样可以用于体外细胞培养, 进一步进行了 COP-PDMS 微流控芯片液体高灌注量和长时程检测以确定其不同细胞培养中应用的稳定性. 本实验中, 根据键合

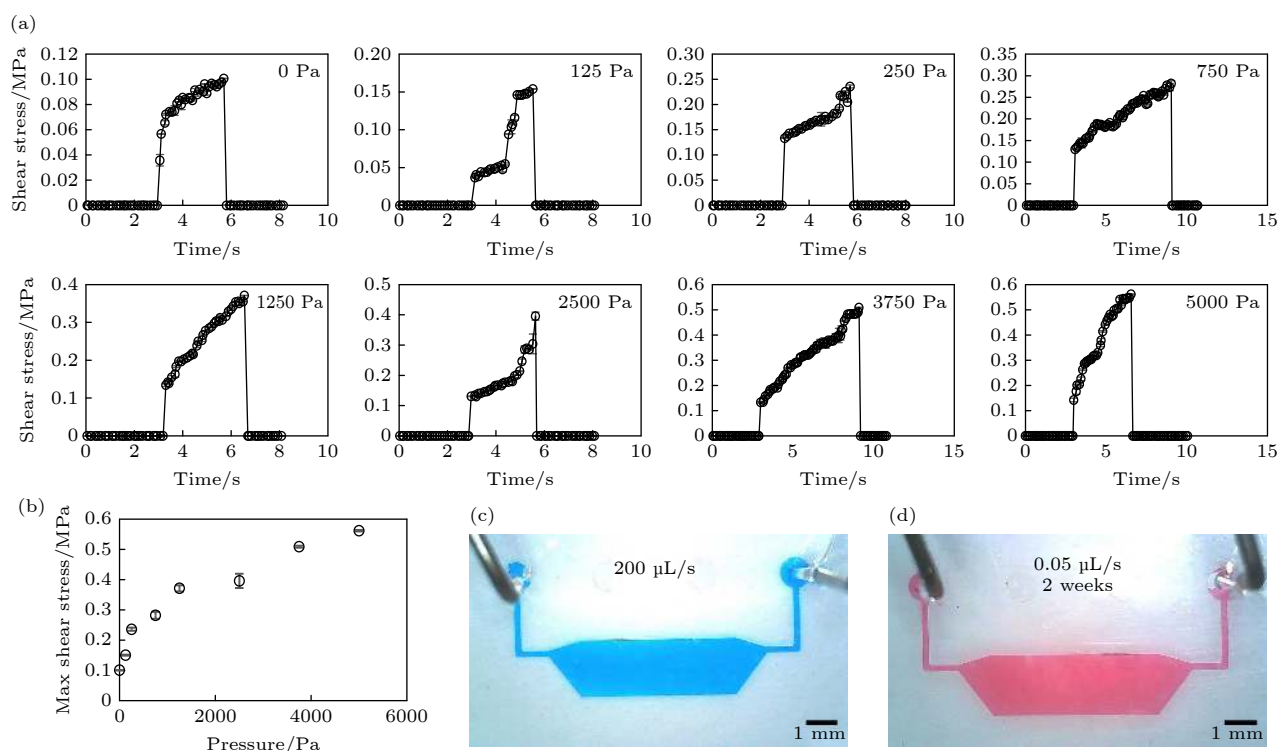


图 3 (a) 键合过程加压后 (0 至 5000 Pa) COP-PDMS 微流控芯片的键合强度测试结果, 键合强度代表的是完全剥离两种材料需要的剪切应力, 该剪切应力通过推拉力计测量得出; (b) 芯片键合强度与额外加压的对应关系; (c) 高灌注速率 (200 $\mu\text{L/s}$) 下沟道变形及密封度变化情况; (d) 2 周长时程动态灌注 (灌注速率为 0.05 $\mu\text{L/s}$) 后沟道变形及密封度变化情况

Fig. 3. (a) Bonding strength test results of COP-PDMS microfluidic device with the vary compressions (0 to 5000 Pa) during the bonding process. The bonding strength represents the shear stress required for completely stripping two materials, which is measured by push-tension meter. (b) The corresponding relationship between the bonding strength of microfluidic device and the compressions during the bonding process. (c) The seal and deformation change of channels and chamber at high fluid perfusion rate (200 $\mu\text{L/s}$). (d) The seal and deformation change of channels and chamber after a 2-week time-course dynamic perfusion (0.05 $\mu\text{L/s}$).

强度结果, COP-PDMS 芯片的键合条件为表面加压 5000 Pa. 基于微流控沟道的设计参数, 计算出了在 COP-PDMS 微流控芯片中模拟生物体内各个器官组织的流体剪切应力所需要的流量 (表 1). 根据计算结果, 采用对应的流量对上述芯片沟道的密封性、完整性进行了测试. 参考表 1 中的结果, 用于测试的流体流量为 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2, 5, 10, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{L/s}$. 测试结果表明, 200 $\mu\text{L/s}$ 及以下的流量产生的剪切应力均不会对 COP-PDMS 微流控芯片的沟道产生形变且不会使两种材料剥离 (图 3(c)). 长时程检测的结果显示, 在经过 2 周、流量为模拟肠腔生物剪切应力的 0.05 $\mu\text{L/s}$ 的灌注后, COP-PDMS 芯片的沟道形状、密封性均未发生变化. 该结果证明, 该 COP-PDMS 微流控芯片的键合条件能够模拟各个器官体内的生物剪切应力, 并能够在长时间的灌注下保持形状和密封性不变, 从而满足后续的生物实验.

表 1 生物体内各个组织器官中的流体剪切应力及在 COP-PDMS 微流控芯片中模拟对应流体剪切应力需要的流体流量

Table 1. Shearing stress in the *in-vivo* tissues and the corresponding fluidic perfusion rate in the COP-PDMS microfluidic device to simulate the shearing stress.

器官	流体剪切应力 $\tau/(\text{dyne}\cdot\text{cm}^{-2})$		对应微流控流量 $Q/(\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1})$	
	最小值	最大值	最小值	最大值
肝脏 ^[25]	0.1	0.5	0.2	1.1
肾脏 ^[26]	0.2	5.0	0.4	10.7
肠道血管 ^[27,28]	2.2	5.5	4.8	11.7
主动脉 ^[25]	1.0	22.0	2.1	47.0
动脉 ^[17,29]	10.0	70.0	21.3	149.4
静脉 ^[30,31]	1.0	6.0	2.1	12.8
毛细血管 ^[25,32]	3.0	95.0	6.4	202.8
活肾小管 ^[17,18]	0.2		0.4	
肠上皮的生理管腔应力 ^[17,18]	0.025		0.0534	

3.5 COP-PDMS 微流控芯片中的动态和静态细胞培养

将肠上皮细胞 Caco-2 接种至 COP-PDMS 微流控芯片后, 首先对比了短期静态培养和动态培养后细胞的贴附生长情况, 验证了在该微流控芯片中动态培养的细胞能够更近似地模拟体内环境中的细胞, 表现为动态培养的肠上皮细胞能够表达更多的细胞间紧密连接蛋白 ZO-1 和细胞骨架微丝蛋

白 F-actin (图 A3(a)). ZO-1 蛋白表达量是肠上皮细胞的一项重要特征, 也是判断肠上皮细胞之间是否形成紧密连接的重要依据. 从荧光染色结果来看, 动态培养的细胞间的 ZO-1 表达出连续的荧光, 且荧光强度高于静态培养的细胞. 相比于传统肠上皮细胞的 3 周静态培养模型以获得细胞极化和胞间紧密连接, 该结果提示了动态流体灌注产生的生物剪切应力能够快速促进肠上皮细胞的极化, 从而促使细胞在短时间合成大量的 ZO-1, 快速形成胞间紧密连接, 这一结果与已报道的 PDMS 与其他材料键合后形成的微流控芯片的结果一致^[33–36]. 微丝蛋白 F-actin 不仅能够作为细胞支架, 还参与细胞器转运、细胞分裂、细胞运动和信号传导. 我们发现, 动态培养下的细胞的骨架表现出了一定的延展性, 且 F-actin 的荧光强度更强, 提示了在动态培养条件下产生的生物剪切应力能够促进细胞中微丝蛋白间的分子相互作用, 从而促进微丝蛋白的组装, 这一发现也在其他类型的微流控芯片中被报道^[37,38]. 与细胞黏附和迁移有关的桩蛋白 Paxillin 在两种培养条件下也表现出显著性差异 (图 A3(b)), 动态培养下的细胞表达出更高的 Paxillin, 提示了生物剪切应力在细胞黏附方面起到了促进作用, 这一发现与前期报道的剪切应力可促进 Paxillin 表达的结果一致^[39,40]. 基于这些发现, 我们在后续太赫兹生物效应的研究中选用了动态培养模型.

3.6 太赫兹辐照对细胞的生物效应

将在 COP-PDMS 微流控芯片中动态培养的 Caco-2 细胞经 0.1 THz 每日辐照 10 min, 辐照 3 天后进行细胞免疫荧光染色, 检测 Caco-2 细胞中 ZO-1, Paxillin 和 F-actin 的表达及分布 (图 4(a) 和图 4(b)). 从 F-actin 染色的图片上可以看出, 未进行太赫兹辐照的细胞表现出舒展、向外扩散的形态, 细胞边缘规则光滑; 而经太赫兹辐照后 Caco-2 细胞有一定程度的收缩, 游离的未与其他细胞接触的细胞边缘呈一定的毛刺状, 提示太赫兹辐照后的肠上皮细胞与培养介质可能发生贴附减弱的现象. 从 F-actin 的表达水平上看 (图 4(c)), 辐照后的 F-actin 蛋白量并未显著改变, 但从图中看出, 太赫兹辐照的 Caco-2 细胞中 F-actin 形成的纤维状结构减少. Yamazaki 等^[5]前期报道了太赫兹辐射能够影响细胞微丝蛋白 Actin 的聚合, 本文在细胞中观

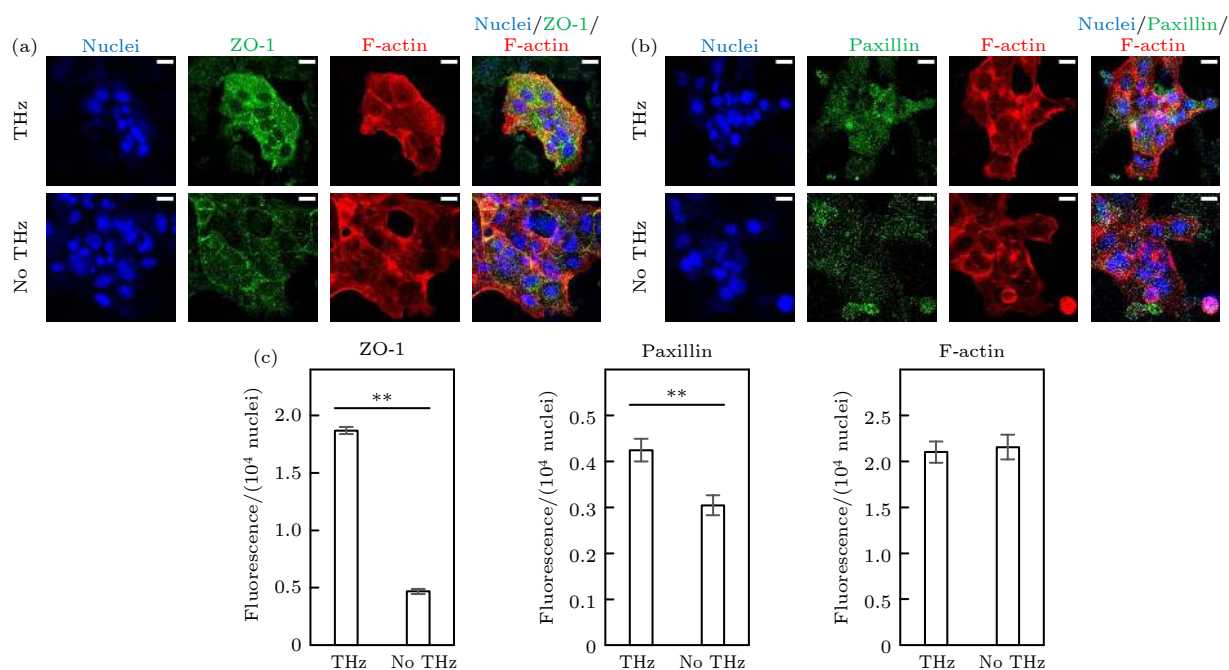


图4 太赫兹辐照对 COP-PDMS 微流控芯片中动态培养的 Caco-2 细胞的 ZO-1, Paxillin 和 F-actin 的免疫荧光检测 (图中基准尺为 20 μm) (a) ZO-1 与 F-actin 的免疫荧光染色; (b) Paxillin 与 F-actin 的免疫荧光染色; (c) 对 (a) 和 (b) 图中太赫兹辐照前后 ZO-1, Paxillin 和 F-actin 免疫荧光强度定量分析结果 (t 检验显著性差异: $p < 0.05$, *; $p < 0.01$, **)

Fig. 4. Immunofluorescence staining results of Caco-2 cells that are dynamically cultured in COP-PDMS microfluidic device, before and after terahertz irradiation (scale bar: 20 μm). (a) The confocal result of ZO-1 and F-actin. (b) The confocal result of Paxillin and F-actin. (c) Quantitative analysis of immunofluorescence intensity of ZO-1, Paxillin and F-actin of the cells in panel (a) and (b): The quantification is determined as immunofluorescence intensity corresponding to 10^4 nuclei (significance of t -test: $p < 0.05$, *; $p < 0.01$, **).

察到了太赫兹辐照后细胞内 F-actin 聚集形态的变化, 进一步提示太赫兹可能对细胞内 Actin 蛋白间的相互作用具有调控作用。

对 Caco-2 细胞中 ZO-1 的免疫荧光染色结果显示, 未经辐照的 Caco-2 细胞中 ZO-1 在细胞膜表面特别是相邻细胞相互接触的细胞膜界面上表现出较亮和较粗的荧光; 而在太赫兹辐照后的 Caco-2 细胞中, ZO-1 在细胞内呈现弥散样分布, 其在细胞膜上的定位不明显。对 ZO-1 荧光强度进行定量分析发现, 辐照后的肠上皮细胞 ZO-1 的水平是未经太赫兹辐照细胞的 4 倍。这些结果显示太赫兹辐照可以改变 Caco-2 细胞中胞间紧密连接蛋白 ZO-1 在细胞内的分布, 促进 ZO-1 蛋白水平的升高, 提示太赫兹能够对细胞紧密连接的结构和功能产生影响。此外, 对桩蛋白 Paxillin 的免疫荧光检测也发现, 太赫兹辐照后的 Caco-2 细胞中 Paxillin 的荧光信号强度增强, 且部分细胞中 Paxillin 出现了局部聚集分布的现象 (图 4(b)), 这一结果提示太赫兹辐照可以提高 Paxillin 蛋白的水平, 且对细胞与基质的黏附产生的影响。

综合上述结果, 我们认为 0.1 THz 辐照可能会减弱细胞外及细胞间的黏附作用, 推测 ZO-1 与 Paxillin 蛋白水平的升高则可能是细胞应对黏附作用降低的一种代偿性反应, 进一步详细的机制仍需要更深入的实验研究。

4 结 论

本文开发了新的 COP 与 PDMS 键合方法, 设计并制备了适用于太赫兹细胞水平生物效应研究的 COP-PDMS 微流控芯片。该键合方法制备的 COP-PDMS 微流控芯片黏合强度和密封性均能达到与目前常用的微流控材料的相同水平, 并且在瞬时高灌注量和长时程灌注检测中, 能保持沟道无形变且密封性完好, 可用于体外细胞的动态培养、太赫兹辐照处理及进一步的激光共聚焦显微镜观察, 为太赫兹细胞水平生物效应的研究提供了便利的条件。基于该芯片开展了肠上皮细胞 Caco-2 的动态培养及 0.1 THz 对细胞黏附功能影响的研究, 发现 0.1 THz 可引起肠上皮细胞胞间紧密连接蛋白

ZO-1 和桩蛋白 Paxillin 的水平升高及细胞黏附状态的改变, 提示辐照可能会减弱细胞外及细胞间的黏附作用. 基于本研究制备的 COP-PDMS 微流控芯片, 未来可以进一步开展 0.1 THz 对细胞黏附功能影响的实时动态观察, 以深入揭示其作用的过程和分子机制.

感谢青岛青源峰达太赫兹科技有限公司在 COP 和 PDMS 样片太赫兹吸收率检测中的帮助; 感谢西安电子工程研究所石东辰老师在推拉力计建模、软件调试和测试中的帮助; 感谢西安交通大学生命科学与技术学院许丹老师提供的 Caco-2 细胞.

附录A 微流控芯片设计、等离子处理及细胞培养的免疫荧光检测结果

图 A1 给出了微流控芯片沟道设计 CAD 图及设计参数. 图 A2 为 COP 材料等离子改性前后亲水性测试, 测试结果显示, 经过发射功率为 150 W, 时间为 60 s 的等离子处理后, COP 材料表面呈现明显的亲水性: 滴落在表面的液滴由未处理前的球状变为平铺状. 图 A3 给出了在 COP-

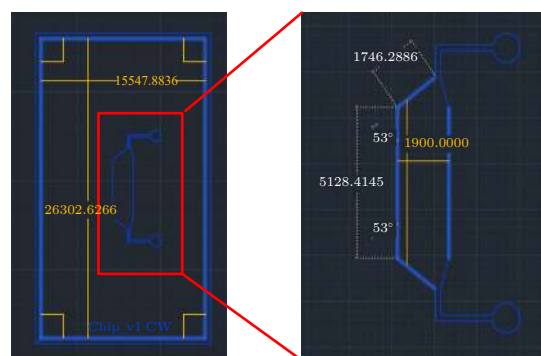


图 A1 微流控芯片沟道设计 CAD 图及设计参数

Fig. A1. CAD drawing and design parameters of the channel design of microfluidic chip.

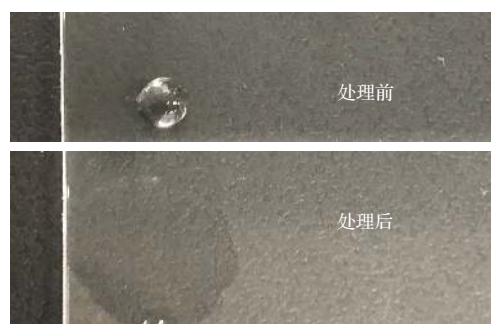


图 A2 COP 材料等离子改性前后亲水性测试

Fig. A2. Hydrophilicity test of COP material before and after plasma modification.

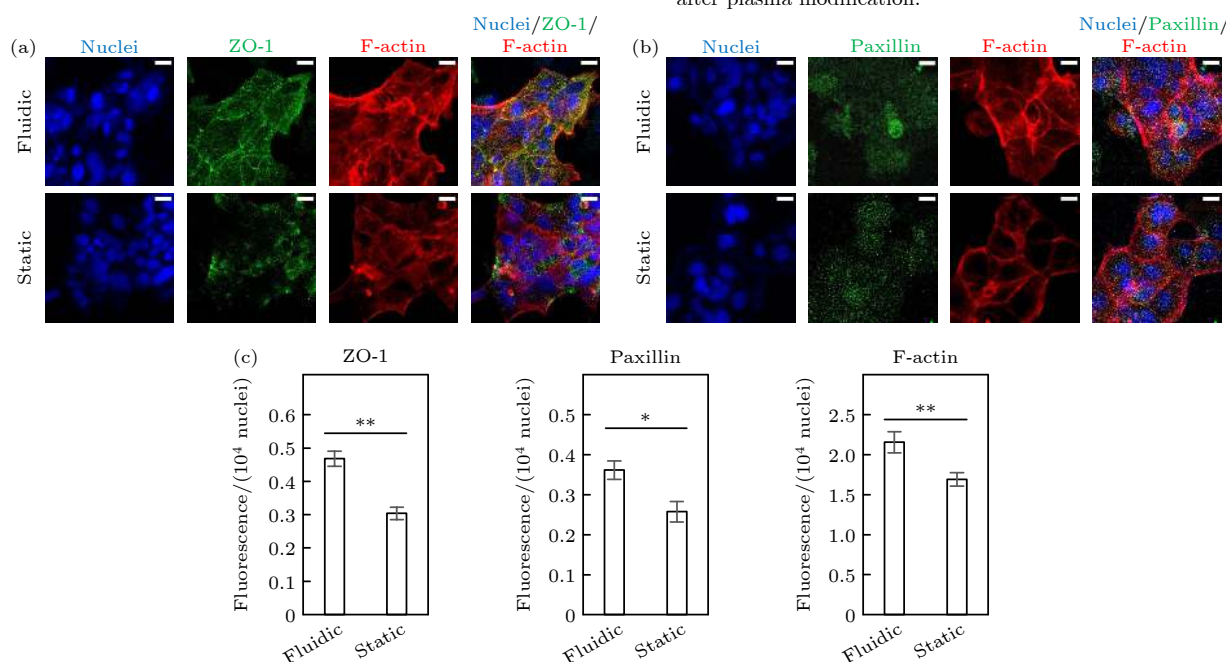


图 A3 在 COP-PDMS 微流控芯片中动态和静态培养中, Caco-2 细胞的 ZO-1, Paxillin 和 F-actin 的免疫荧光检测 (图中基准尺为 20 μm) (a) ZO-1 与 F-actin 的免疫荧光染色; (b) Paxillin 与 F-actin 的免疫荧光染色; (c) 对 (a) 和 (b) 图中太赫兹辐照前后 ZO-1, Paxillin 和 F-actin 免疫荧光强度定量分析结果 (t 检验显著性差异: $p < 0.05$, *, $p < 0.01$, **)

Fig. A3. Immunofluorescence staining results of Caco-2 cells that are dynamically and statically cultured in COP-PDMS microfluidic device (scale bar: 20 μm). (a) The confocal result of ZO-1 and F-actin. (b) The confocal result of Paxillin and F-actin. (c) Quantitative analysis of immunofluorescence intensity of ZO-1, Paxillin and F-actin of the cells in panel (a) and (b): The quantification is determined as immunofluorescence intensity corresponding to 10^4 nuclei (significance of t -test: $p < 0.05$, *, $p < 0.01$, **).

PDMS 微流控芯片中动态和静态培养中, Caco-2 细胞的 ZO-1, Paxillin 和 F-actin 的免疫荧光检测结果. 结果显示, 动态培养下的肠道细胞可被快速极化, 形成紧密连接结构, 并呈现与静态培养不同的细胞形态.

参考文献

- [1] Fröhlich H 1975 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72** 4211
- [2] Smye S W, Chamberlain J M, Fitzgerald A J, Berry E 2001 *Phys. Med. Biol.* **46** R101
- [3] Qin J, Ying Y, Xie L 2013 *Appl. Spectrosc. Rev.* **48** 439
- [4] Greschner A A, Ropagnol X, Kort M, Zuberi N, Perreault J, Razzari L, Ozaki T, Gauthier M A 2019 *J. Am. Chem. Soc.* **141** 3456
- [5] Yamazaki S, Harata M, Idehara T, Konagaya K, Yokoyama G, Hoshina H, Ogawa Y 2018 *Sci. Rep.* **8** 9990
- [6] Titova L V, Ayesheshim A K, Golubov A, Fogen D, Rodriguez-Juarez R, Hegmann F A, Kovalchuk O 2013 *Biomed. Opt. Express* **4** 559
- [7] Olshevskaya J S, Kozlov A, Petrov A K, Zapara T A, Ratushnyak A 2010 *Vestn. Novosib. State Univ. Ser. Phys.* **5** 185
- [8] Alfihed S, Holzman J F, Foulds I G 2020 *Biosens. Bioelectron.* **165** 112393
- [9] Naftaly M, Gregory A 2021 *Appl. Sci.* **11** 6733
- [10] Cunningham P, Valdes N, Vallejo F, Hayden L, Polishak B, Zhou X H, Luo J, Jen A, Williams J, Twieg R 2011 *J. Appl. Phys.* **109** 043505
- [11] Alfihed S, Bergen M H, Ciocoiu A, Holzman J F, Foulds I G 2018 *Micromachines-Basel* **9** E453
- [12] Cheng C, Zhu Z, Li S, Ren G, Zhang J, Cong H, Peng Y, Han J, Chang C, Zhao H 2019 *RSC Adv.* **9** 20240
- [13] George P A, Hui W, Rana F, Hawkins B G, Smith A E, Kirby B J 2008 *Opt. Express* **16** 1577
- [14] Wang C, Dang T, Baste J, Joshi A A, Bhushan A 2021 *FASEB J.* **35** e21291
- [15] Wang C, Tanataweethum N, Karnik S, Bhushan A 2018 *ACS Biomater. Sci. Eng.* **4** 1377
- [16] Xu B Y, Yan X N, Xu J J, Chen H Y 2012 *Biomicrofluidics* **6** 16507
- [17] Jang K J, Mehr A P, Hamilton G A, McPartlin L A, Chung S, Suh K Y, Ingber D E 2013 *Integr. Biol.* **5** 1119
- [18] Kim S W, Ehrman J, Ahn M R, Kondo J, Lopez A A M, Oh Y S, Kim X H, Crawley S W, Goldenring J R, Tyska M J, Rericha E C, Lau K S 2017 *Mol. Biol. Cell* **28** 3043
- [19] D'Angelo F, Mics Z, Bonn M, Turchinovich D 2014 *Opt. Express* **22** 12475
- [20] Kim H T, Jeong O C 2011 *Microelectron. Eng.* **88** 2281
- [21] Borók A, Laboda K, Bonyár A 2021 *Biosensors-Basel* **11** 292
- [22] Kratz S R A, Bachmann B, Spitz S, Höll G, Eilenberger C, Goeritz H, Ertl P, Rothbauer M 2020 *Sci. Rep.* **10** 1400
- [23] Xiong L, Chen P, Zhou Q 2014 *J. Adhes. Sci. Technol.* **28** 1046
- [24] Ouellet E, Yang C W, Lin T, Yang L L, Lagally E T 2010 *Langmuir* **26** 11609
- [25] Rashidi H, Alhaque S, Szkolnicka D, Flint O, Hay D C 2016 *Arch. Toxicol.* **90** 1757
- [26] Kimura H, Nishikawa M, Yanagawa N, Nakamura H, Miyamoto S, Hamon M, Hauser P, Zhao L, Jo O D, Komeya M, Ogawa T, Yanagawa N 2018 *Biomicrofluidics* **12** 044107
- [27] Qamar M I, Read A E 1987 *Gut* **28** 583
- [28] Takahashi T 2011 *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **57** 265
- [29] Paszkowiak J J, Dardik A 2003 *Vasc. Endovas. Surg.* **37** 47
- [30] van Haaften E E, Wissing T B, Rutten M C M, Bulsink J A, Gashi K, van Kelle M A J, Smits A, Bouten C V C, Kurniawan N A 2018 *Tissue Eng. Part C* **24** 418
- [31] Morinaga K, Okadome K, Kuroki M, Miyazaki T, Muto Y, Inokuchi K 1985 *J. Vasc. Surg.* **2** 430
- [32] Koutsiaris A G, Tachmitzi S V, Batis N 2013 *Microvasc. Res.* **85** 34
- [33] Tan H Y, Trier S, Rahbek U L, Dufva M, Kutter J P, Andresen T L 2018 *PLoS One* **13** e0197101
- [34] Delon L C, Guo Z, Oszmiana A, Chien C-C, Gibson R, Prestidge C, Thierry B 2019 *Biomaterials* **225** 119521
- [35] Chi M, Yi B, Oh S, Park D, Sung J H, Park S 2015 *Biomed. Microdevices* **17** 9966
- [36] Sakharov D, Maltseva D, Knyazev E, Nikulin S, Poloznikov A, Shilin S, Baranova A, Tsypina I, Tonevitsky A 2019 *BMC Syst. Biol.* **13** 19
- [37] Strelnikova N, Herren F, Schoenenberger C A, Pfohl T 2016 *Front. Mater.* **3** 20
- [38] Spuul P, Chi P Y, Billottet C, Chou C F, Génot E 2016 *Methods* **94** 65
- [39] Cheng M, Guan X, Li H, Cui X, Zhang X, Li X, Jing X, Wu H, Avsar E 2013 *PLoS One* **8** e67675
- [40] Manevich E, Grabovsky V, Feigelson S W, Alon R 2007 *J. Biol. Chem.* **282** 25338

SPECIAL TOPIC—Terahertz biophysics

Fabrication of cyclic olefin polymer and polydimethylsiloxane co-bonded microfluidic device and its applications in terahertz biological effects on intestinal cells^{*}

Wang Cheng-Yao¹⁾ Li Xu²⁾ Lu Xiao-Yun^{1)2)†}¹⁾ (National Center for International Research on Transient Electromagnetics & Applications (TEA),

Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

²⁾ (Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, Institute of Mitochondrial Biology and Medicine,

School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

(Received 28 September 2021; revised manuscript received 22 November 2021)

Abstract

The current research on the terahertz biological effects at a cellular level is limited by the conventional petri dishes used for cell culture, which cannot be directly used for confocal laser microscopy. In this research, the cycloolefin polymer (COP), a material that possesses low terahertz absorption rate but excellent optical property for microscopy, is bonded to polydimethylsiloxane (PDMS), thereby developing a novel COP-PDMS microfluidic device by using the techniques of soft etching, photolithography, plasma cleaning, high-temperature and high-pressure incubation. The bonding strength of resulting device is tested by using a push-tension meter. The results indicate that the developed device shows a bonding strength as strong as the device fabricated by quartz and PDMS, which is thought as the tightest binding in the multiple types of microfluidic device. In addition, by perfusing the device chamber at a high flow rate (200 $\mu\text{L/s}$) and long-term time-course (2 weeks), which simulates the dynamic shearing stress occurring in *in-vivo* organs and tissues, this COP-PDMS microfluidic device can still maintain the original shape and sealing property, indicating that this device qualifies the requirements of the following dynamic cell culture.

The biological effects of terahertz on the cells are explored by using this COP-PDMS microfluidic device mentioned above. In this device, we develop the dynamic culture of intestinal epithelial cells Caco-2 with a perfusion rate of 0.05 $\mu\text{L/s}$, which meets the findings of the *in-vivo* gastrointestinal lumen shearing stress. The Caco-2 cells are then irradiated with 0.1 THz wave with the power of 15 mW/cm² for 3 days, and the irradiation duration is 10 min per day. The biological effects of terahertz irradiation on the intercellular tight junction protein ZO-1, the Paxillin relating to the cell adhesion and migration, and the cytoskeletal microfilament protein F-actin of Caco-2 cells are detected in the device directly using the technique of immunofluorescence staining.

The results show that the morphology of cell adhesion as well as the level and distribution of ZO-1 and Paxillin are changed. In brief, the protein expression of ZO-1 and Paxillin are induced more by the terahertz irradiation, while the F-actin is not influenced by the irradiation. As can be seen from the F-actin results, the cells without terahertz irradiation show a spread and outward shape with regular smooth cell edge while a contraction and burr shape of cell edge are shown after irradiation, suggesting that the cell adhesion is weakened after irradiation. Even though the expression level of F-actin is consistent, the changed morphology indicates that terahertz may regulate the interaction and aggregation among actin proteins in cells.

^{*} Project supported by the Joint Fund of the National Natural Science Foundation of China and the China Academy of Engineering Physics (Grant No. U2030105).

[†] Corresponding author. E-mail: luxy05@xjtu.edu.cn

Interestingly, the ZO-1 presents diffuse distribution in the cells and its location on the cell membrane is not obvious, that is, a large amount of ZO-1 expresses not only on the cell membrane but also in the intracellular matrix after the irradiation. The expression of Paxillin is enhanced after terahertz irradiation, and some cells show local aggregation and distribution of Paxillin. These indicate that the terahertz irradiation might affect the biomolecular mechanism of synthesis and distribution of protein. The COP-PDMS co-bonded microfluidic device developed in this study provides a convenient and effective platform for exploring the biological effects of terahertz irradiation on cells, and is expected to be further used for real-time research on the effects of terahertz on cells and molecules in the future.

Keywords: cyclic olefin polymer, microfluidic device, terahertz biological effects

PACS: 87.50.up, 81.05.-t, 87.85.Ox

DOI: [10.7498/aps.70.20211807](https://doi.org/10.7498/aps.70.20211807)