

微流体芯片中的癌症生物物理研究*

容晓晖 顾长志 刘雳宇[†]

(中国科学院物理研究所 北京 100190)

2013-11-26收到

[†] email: liu@iphy.ac.cn

DOI: 10.7693/wl20140401

Cancer biophysics research in microfluidic landscapes

RONG Xiao-Hui GU Chang-Zhi LIU Li-Yu[†]

(Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

摘要 文章从生物物理的新角度出发,介绍了如何利用微流体技术研究癌症的一系列重大问题,其中包括:构建三维微型结构体,用于在体外模拟和研究肿瘤细胞侵袭组织的细胞生物行为;开发新型微流体芯片,以检测血液中循环肿瘤细胞,并分析将其应用于临床中的可能性。文章还展望了飞秒激光三维直写技术构建肿瘤细胞转移模型的应用前景。

关键词 生物物理, 癌症, 微流体, 细胞行为, 3-D打印

Abstract From a biophysics viewpoint we describe our efforts in constructing a series of microfluidic biochips for studying the collective invasive behavior of cancer cells in 3-D structures. Our work includes the detection of circulating tumor cells in blood with microfluidic technology. We also discuss the promising future of femtosecond laser direct-writing technology in constructing and studying cancer metastasis in vitro.

Keywords biophysics, cancer, microfluidics, cell behaviors, 3-D printing

1 引言

癌症是现今对人类健康最具威胁的疾病^[1]。与人类的获得性免疫缺陷综合症(艾滋病)相比,它不仅有着极高的致死率,而且至今都没有公认有效的预防和治疗方法。癌症并不是人们通常所认为的生活健康就能远离的疾病。正常细胞在压力积累下(如自由基损害、长期炎症等)都可能因变异而引发异常增生,以至发展成癌。在当今各种社会压力增大的情况下,每个人随着年龄增长都可能面临因细胞变异积累而患癌的风险。虽然在过

去半个世纪以来,癌症研究一直是全球基础科学和临床研究的焦点,但与心血管疾病致死率的大幅度下降相比,癌症的致死率一直居高不下。目前致癌、抑癌基因及相关蛋白已经发现了近千种,针对各种靶标的化疗药物也层出不穷,投入的人力、资金更是难以计数,可我们在面对癌症时还是显得无能为力,甚至连它的确切起因都还没弄清楚,这是否表明我们传统的路子出了问题?是否需要引入一些新思维、新方法?说起癌症研究,通常人们首先想到的就是生物和医学领域。那么物理是否可以研究癌症,怎样研究?相比传统的生物和医学,物理能否对癌症研究提供特别的视角和独特的贡献呢?

其实物理在癌症治疗和诊断中早已扮演了至

* 国家重点基础研究发展计划(批准号:2013CB837200)资助项目

关重要的角色：X光、CT是日常肿瘤诊断中不可或缺的手段，磁共振成像(MRI)、正电子断层扫描(PET)更是能提早、精确发现肿瘤的利器。在癌症治疗中，各种放射疗法便是利用X射线、 γ 射线、质子束等治疗恶性肿瘤，在中国大约70%的癌症病人都接受过放射疗法。流式细胞仪可以利用激光源和光学系统对荧光染色的癌细胞进行挑选和分类。近四五年来，具备高度集成性和生物兼容性的微癌症活体外的研究作为新实验平台在我国已崭露头角。中国科学院物理研究所微流体生物物理实验室利用三维微流体生物芯片模拟体内细胞侵袭的环境^[2]，定量研究了癌细胞的侵袭性，开发了从血液中检测循环肿瘤细胞(CTC)的新方法，同时探讨了新一代飞秒激光直写系统在建立癌细胞转移模型中的应用。

2 癌细胞的三维转移

癌细胞除了具有无限增殖这一本色外，还有一个特色就是容易“移动”。“移动”就是癌的转移，恶性肿瘤细胞发展到一定程度时，癌细胞脱离原位开始侵袭周围的正常组织，接着癌细胞进入淋巴和血液系统，顺着体液循环到全身，寻找合适的“土壤”继续生长。到了此时，癌细胞已经具备对组织和免疫系统极大的破坏力，大约90%的病人都是死于癌症转移，而癌症转移与其侵袭特性有着密切关系。尽管如此重要，可是传统的生物医学研究和手段几乎都只能着眼于如何杀死癌细胞和控制肿瘤的大小，对于肿瘤转移扩散这一致命过程束手无策，也甚少研究。肿瘤的转移扩散是在三维活体组织中的一个复杂缓慢的群体行为，几乎无法开展活体研究，这需要有新的思维。因此我们借助微纳米加工技术，构建了微型结构，希望借助活体外能更好地观测细胞和操控微环境的优点，研究不同种类癌细胞在复杂环境中的侵

袭性以及它们的集团行为。

2.1 癌细胞会“攀楼”

癌症转移是一个癌细胞侵袭三维组织的过程，癌细胞从它们最初的据点开始传播并开拓远处的微环境。使用传统的培养皿，癌细胞仅能在二维平面上生长，这显然是不能够模拟体内三维环境研究癌细胞的转移性质(图1)，于是我们就设想是否可以利用三维芯片来模拟细胞在人体内的三维侵袭过程^[3]。

为了达到这一目标，研究组首先利用Bosch深蚀刻方法，构建了一系列由100个方形“高台”组成的三维拓扑微结构。图2(a)显示这些高台高于底部300 μm 以上。实验中将强转移性前列腺癌细胞PC-3和弱转移性前列腺癌细胞LNCaP放置在高台底部，癌细胞会像“蜘蛛侠”一样沿着“世贸大楼”(高台)壁向上攀登，最后到达高台顶端。它们随时间占据高台顶端的速率可以用来评估这些癌细胞的运动侵袭能力。通过统计发现，具有强转移性的PC-3细胞在144小时后就较快地占领了所有的高台顶部，而弱转移性的LNCaP细胞却花费了312小时占领“楼顶”达到平衡态(图2(b)所示)。不仅如此，LNCaP从未占据过所有高台的顶部(最多只能占领大约85%的高台顶部)。

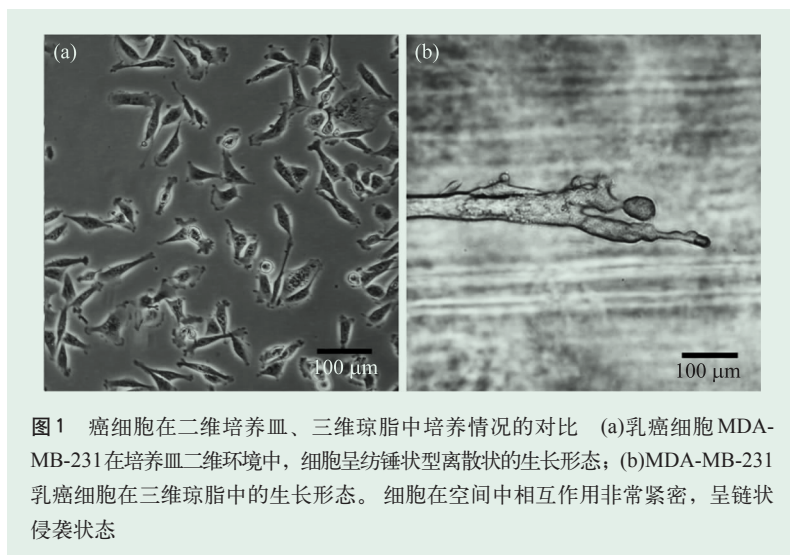


图1 癌细胞在二维培养皿、三维琼脂中培养情况的对比 (a)乳腺癌细胞MDA-MB-231在培养皿二维环境中，细胞呈纺锤状型离散状的生长形态；(b)MDA-MB-231乳腺癌细胞在三维琼脂中的生长形态。细胞在空间中相互作用非常紧密，呈链状侵袭状态

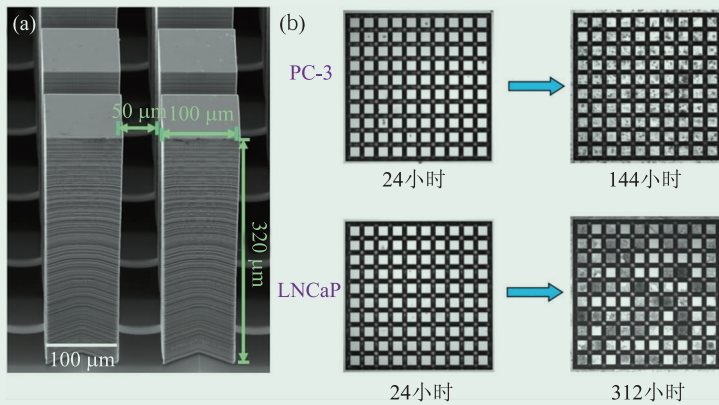


图2 高台拓扑微结构 (a)利用硅片湿法刻蚀得到的高台结构电镜照片,可以看出三维结构有着很大的高宽比;(b)强转移性前列腺癌细胞PC-3和弱转移性前列腺癌细胞LNCaP随着时间占领高台表面的情况

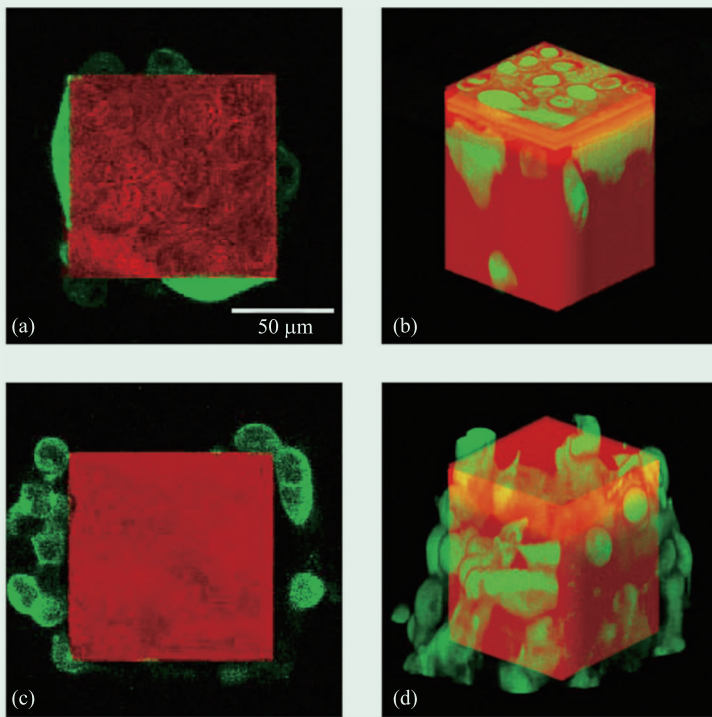


图3 使用共聚焦显微镜观察PC-3和LNCaP侵袭高台时呈现出不同的三维形态,其中红色显示的是高台结构,绿色显示的是含有绿色荧光蛋白的肿瘤细胞((a)和(c)为俯视图,(b)和(d)为三维合成图。观察(a)和(b)可以发现,PC-3生长时,多为通过攀附侧壁最后聚集在顶部;观察(c)和(d),则发现LNCaP多聚集在侧壁形成细胞团,只有很少一部分癌细胞到达顶部)

为了理解弱转移性癌细胞LNCaP不能完全占领高台顶部的机制,我们通过荧光标记的方法将癌细胞进行荧光标记,再使用共聚焦显微镜对贴附在高台上的癌细胞进行成像。共聚焦显微镜拍摄到的图像(见图3)显示,PC-3细胞的行为模

式相对独立,癌细胞之间没有太多的相互作用,因此可以不受干扰爬行到高台顶部。而LNCaP在高台壁上细胞重合较多,由于癌细胞间的相互作用力较强,在一定概率下可以阻碍其他癌细胞爬行到高台顶端。理论分析表明,癌细胞占据高台的速度满足Fisher方程,即

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = R\rho \left[1 - \frac{\rho}{K} \right] + \frac{\partial}{\partial x} \left[D(\rho) \frac{\partial \rho(x)}{\partial x} \right], \quad (1)$$

其中 R 是细胞的生长率, ρ 是细胞密度,而 $D(\rho) = D_0 \left[\frac{1}{1 + I\rho} \right]$ 表示的是细胞运动的扩散常数,其中 I 的增长与扩散常数成反比。 I 趋于无穷时,则癌细胞不能占据高台顶端时,整个系统达到平衡, I 在这里表示细胞间相互作用及细胞的接触抑制。因此弱转移性癌细胞LNCaP不能完全占据高台顶部可以理解为细胞之间相互作用力太强,使细胞不具备很强的侵袭性,在人体内形成的是非转移的良性肿瘤。而 I 小的癌细胞有很强的独立性,在人体内表现为强转移性。这也符合细胞生物学方面的研究结果,即正常细胞之间本来都具有的互相直接联络的间隙连接在癌细胞中被破坏了。

2.2 贪婪且狡猾的“侵略军”

虽然微加工工艺可以在芯片中建立三维结构,但是肿瘤细胞在本质上依然贴附在芯片平面,呈现二维形态和运动方式。但是在人体内,癌细胞是在三维空间侵袭的。图4(a)显示的是乳癌细胞早期侵袭人体组织的示意图。乳癌细胞由上皮细胞群体变异生成,之后侵袭和破坏细胞外基质结构(ECM),最后打开血管壁进入脉管随血液进入循

虽然微加工工艺可以在芯片中建立三维结构,但是肿瘤细胞在本质上依然贴附在芯片平面,呈现二维形态和运动方式。但是在人体内,癌细胞是在三维空间侵袭的。图4(a)显示的是乳癌细胞早期侵袭人体组织的示意图。乳癌细胞由上皮细胞群体变异生成,之后侵袭和破坏细胞外基质结构(ECM),最后打开血管壁进入脉管随血液进入循

环系统。在此过程中，肿瘤细胞侵袭的动力来自于营养：在组织中营养都比较匮乏，而血液中养分丰富，于是之间形成了营养梯度。肿瘤细胞正是可以探测到该梯度的存在，于是向血管方向侵袭并导致转移发生。为了定量研究营养梯度对于癌细胞侵袭的吸引作用以及癌细胞群侵袭组织的集体行为，研究组在活体外建造了三维微流体模型，用来研究这些问题。图4(b)显示的是该三维芯片的侧视图。实验中将模拟细胞外基质的胶原蛋白混合荧光颗粒，注入玻璃微孔中，同时在玻璃上下表面建立葡萄糖营养梯度，并在上表面放置含有荧光蛋白的乳腺癌细胞，利用生物共聚焦成像技术，定量观测和比较转移性乳腺癌细胞MDA-MB-231和非转移性肿瘤细胞MCF-7的侵袭特性^[4]。

图5是在葡萄糖浓度梯度下癌细胞群侵袭细胞外间质的共聚焦俯视图(图a1—a4)及合成的三维轨迹侧视图(图b1—b4, 图c1, c2, 图d1, d2)。由于微流体利于控制梯度的优点，实验证明在不同葡萄糖浓度梯度下，转移性乳腺癌细胞MDA-MB-231和非转移性乳腺癌细胞MCF-7具有以下侵袭特点：(1)图5(b1—b4)中蓝色是转移性肿瘤细胞MDA-MB-231的原始位置，红色是细胞在葡萄糖浓度梯度的诱导下随时间侵袭三维外基质时

的细胞位置；(2)图5(c1, c2)显示，如果在实验装置中去除葡萄糖梯度，即使细胞起始端有充分的葡萄糖营养，MDA-MB-231细胞也不会发生转移；(3)图5(d1, d2)显示，就算有葡萄糖梯度，非转移性肿瘤细胞MCF-7也不能发生侵袭。这从实验方面证实了沃伯格效应(Warburg effect)，癌细胞就像一个极度贪婪自私的人，它们不但会疯狂地掠夺食物(葡萄糖)，而且还能诱导血管增生来为其特别供应食物，狼吞虎咽后又“消化不良”。正常细胞的葡萄糖主要通过丙酮酸氧化的有氧代谢途径，在线粒体中将能量储存到细胞中的“能量货币”三磷酸腺苷(ATP)分子中，此时平均一个葡萄糖分子可以转化36个单位的ATP分子，癌细胞中葡萄糖则主要是经乳酸发酵的厌氧代谢途径，在细胞质中进行，此时平均一个葡萄糖分子只产生2个单位的ATP分子能量，效率非常低下。恶性肿瘤内部也因此呈现较高的酸性和低含氧量的微环境，这种选择压力会促使肿瘤细胞加速进化以求适应，同时迁移以寻求新的适宜微环境，这很可能是肿瘤产生转移性的主要原因^[5]。

不仅如此，癌细胞侵袭中还出现了很有趣的物理现象。实验显示，癌细胞群并不是只是受梯度影响而侵袭，详细研究细胞群中个体癌细胞的位置改变，发现癌细胞群要比我们想象的更有

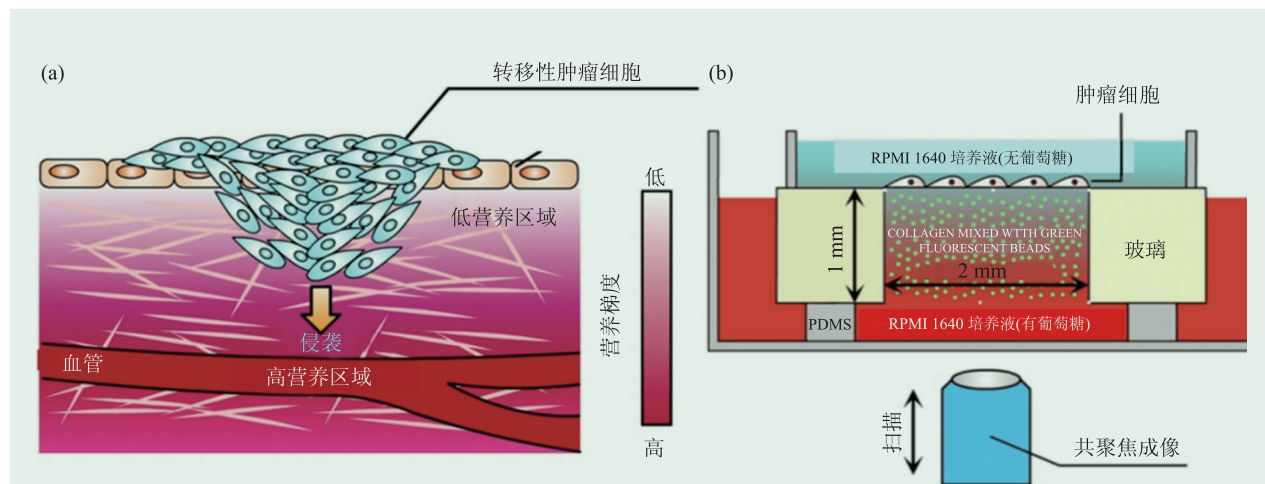


图4 转移内环境的实验模拟 (a)乳腺癌细胞早期转移图。乳腺细胞变异成癌细胞后破坏上皮细胞，在营养梯度的驱动下，破坏人体组织向血管方向侵袭；(b)根据微加工工艺建立的活体外肿瘤细胞三维侵袭的物理模型。在该模型中，建立葡萄糖梯度模拟营养梯度，吸引放置在上层的肿瘤细胞(PDMS是聚二甲基硅氧烷的缩写，它具有良好的生物兼容性)

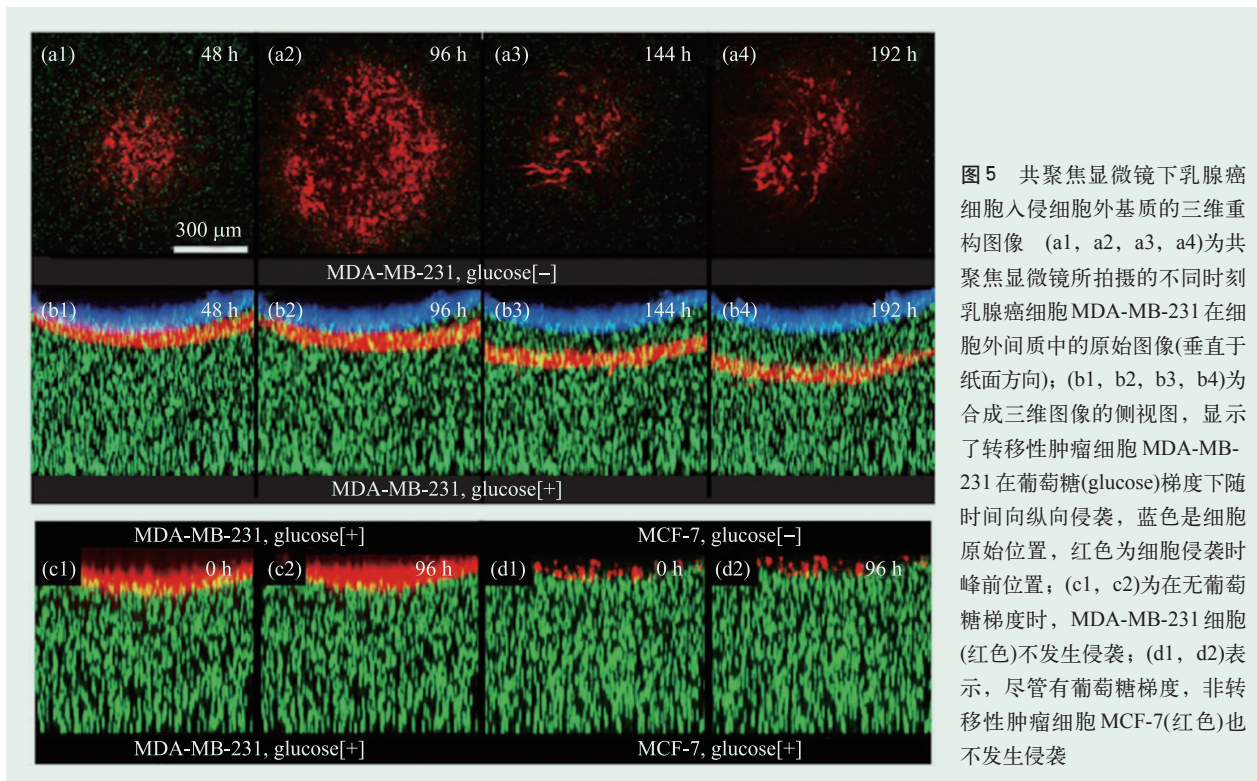


图5 共聚焦显微镜下乳腺癌细胞入侵细胞外基质的三维重构图像 (a1, a2, a3, a4)为共聚焦显微镜所拍摄的不同时刻乳腺癌细胞MDA-MB-231在细胞外间质中的原始图像(垂直于纸面方向); (b1, b2, b3, b4)为合成三维图像的侧视图, 显示了转移性肿瘤细胞MDA-MB-231在葡萄糖(glucose)梯度下随时间向纵向侵袭, 蓝色是细胞原始位置, 红色为细胞侵袭时峰前位置; (c1, c2)为在无葡萄糖梯度时, MDA-MB-231细胞(红色)不发生侵袭; (d1, d2)表示, 尽管有葡萄糖梯度, 非转移性肿瘤细胞MCF-7(红色)也不发生侵袭

“智慧”，这些癌细胞的侵袭行为有可能遵从约翰纳什(John Forbes Nash)的博弈理论。在侵袭细胞外基质时，领头细胞出现了周期性交换位置的现象。因为最前方侵袭细胞外基质的癌细胞需要克服最多的胶原蛋白组织的阻力前进，而后方的癌细胞可以尾随前方的癌细胞而不需要承担阻力，所以后方的癌细胞在侵袭时可以更“省力”。为了达到最有效的侵袭结果，后方癌细胞周期性地替换前方癌细胞，成为领头者并主动去承担阻力，等到其“疲惫”时又再被其他癌细胞所替代，使领头侵袭的癌细胞始终处于最有“精力”的状态。这种周期行为表明，癌细胞之间可能存在着相互合作的博弈行为，以使癌细胞群整体的侵袭行为快速高效。这非常像参加自行车赛的选手采用的策略，各选手间既互相竞争又必须合作成小团队，以减低风阻，才能使得胜利的机率最大化^[6]。

3 癌细胞临床检测芯片

除了对癌细胞转移性质进行基础性研究外，

研究组也将微流体技术应用于癌症诊断，例如研制能从病人血液中分离极少量癌细胞的微流体芯片。循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是指由肿瘤病人原发病灶扩散进入外周血循环的肿瘤细胞。肿瘤病灶附近的淋巴管和血管是癌症转移过程中的“咽喉要道”，通过它们癌细胞才能转移扩散到身体其他组织或器官。如果我们采取某种方法在合适部位设置一些“检查站”，那么癌细胞的“行军动向”和“转移规模”就暴露无疑了。这种方法可有效地应用于体外早期诊断、化疗药物的快速评估、个体化治疗、肿瘤复发的监测等，而从血液中分离出CTCs则是实现这一切的最初也是最根本的步骤。但随之而来的一个重大难题是：CTCs和血液中其他细胞相差无几，而数目又是如此稀少，甚至数十亿个正常细胞中才隐藏有一个癌细胞，这无异于大海捞针。而在实际临床应用中，由于血液粘稠，容易凝固等特点，因此这“针”还必须又快又好地捞出来才行，而通常实验室里的微流体芯片处理的流量只在 $\mu\text{l}/\text{min}$ 量级，凝固和堵塞都是问题，这远远不能满足临床上数毫升样品的处理要求。目

前美国食品药品监督管理局批准的唯一一家 CTCs 检测产品仍然是基于传统的免疫磁性颗粒吸附的方法, 存在识别率低、操作繁琐、不能全自动化、依赖专用的试剂仪器以及只能识别有限的几种癌细胞等问题。

为了解决以上问题, 研究组设计了一种检测血液流量速率为 10 ml/min 数量级的微流体装置^[7]。图 6 显示, 由于 CTCs 通常比红细胞及大部分白细胞大一点点, 或者 CTCs 以团簇的形式存在, 只要采用能够使在某一临界尺寸以上的细胞产生侧向位移的阵列(DLD)^[8], 就可以从连续流动的血液中分离出 CTCs。实验表明, 这个装置可以以高于 85% 的效率从血液中分离出 CTCs, 血液的流动速率可达 10 ml/min, 其流速远远高于之前使用的其他微流装置, 而且不会影响捕获的癌细胞活力, 使得分离出来的细胞可以进行下一步的培养和分析。在实际使用时, 并联多个相同的这种装置, 可以使流量很容易地增大一个量级, 而串联这样的装置, 则可以将富集效果成指数增加。如果再与其他基于癌细胞表面抗原识别的方法结合起来, 则可以很好地同时解决效率和捕获率的问题。

4 癌症物理研究的新方向

综上所述, 传统的微流体加工方法在癌症生

物物理方面的研究已经取得了重要进展。但是未来的体外癌症研究势必需要构建更为复杂的三维结构, 因此亟需更为先进的三维加工技术。研究组在一年前已经开始使用飞秒激光三维直写系统, 来设计和制备可用于癌症研究的三维微纳米生物兼容性结构。飞秒激光双光子聚合技术是指通过飞秒激光光子来诱导产生光聚合过程。当激光聚焦在光刻胶上时, 在物镜焦点处体积很小的位置上会发生双光子聚合作用, 通过样品台的精确位移控制, 使物镜焦点处空间体积沿设定的路径分布, 并在三维空间实现聚合反应, 形成三维结构。在使用生物兼容性光刻胶 Ormocomp 时, 细胞可以在三维结构中健康生长。

研究组现在已经成功通过计算机辅助设计(CAD)的方法, 设计可直接被激光直写系统加工的三维微纳米结构。在活体外建立肿瘤细胞三维转移的模型并研究癌细胞的转移机制是我们研究组的主要目标。图 7(a)左下图是肿瘤细胞发生多点转移的示意图。肿瘤细胞脱离原发位置后通过血管流向不同的远端组织, 并进行转移。通过 CAD 方法可以构建图示的三维结构, 包括一个原始肿瘤位置, 其衍架结构用于支撑和固定细胞外基质, 而其余三处衍架用于模拟细胞转移位置。中间空心管道用于模拟血管, 连接原端肿瘤位置及转移位置。图 7(b)的 SEM 照片显示的是设计图

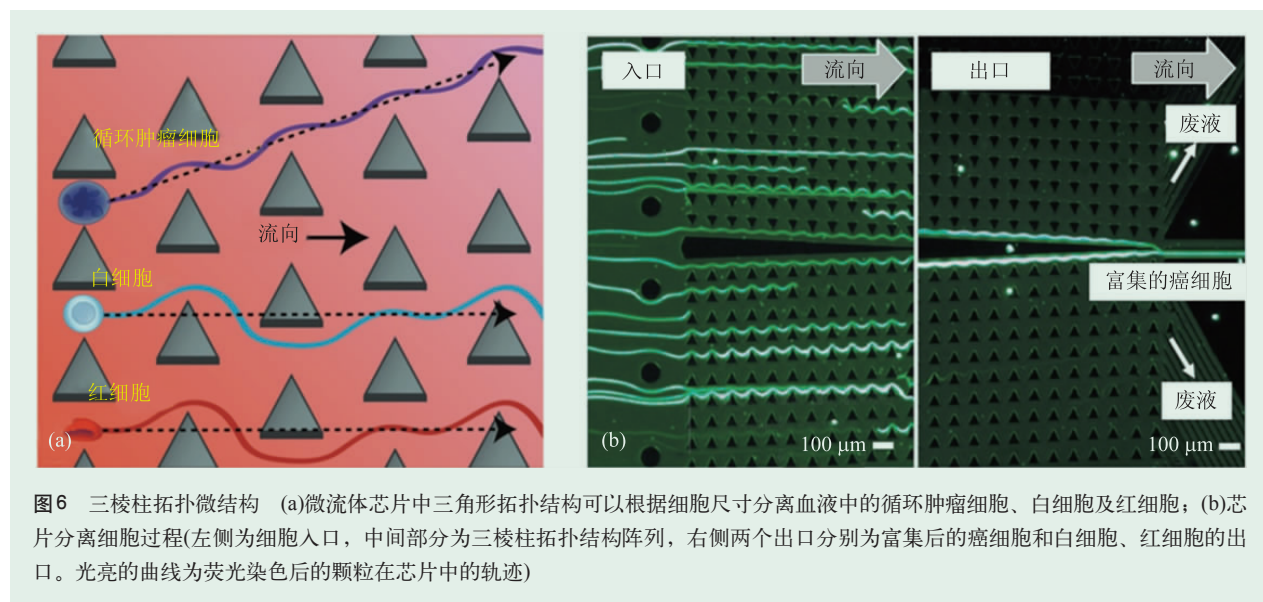


图6 三棱柱拓扑微结构 (a)微流体芯片中三角形拓扑结构可以根据细胞尺寸分离血液中的循环肿瘤细胞、白细胞及红细胞; (b)芯片分离细胞过程(左侧为细胞入口, 中间部分为三棱柱拓扑结构阵列, 右侧两个出口分别为富集后的癌细胞和白细胞、红细胞的出口。光亮的曲线为荧光染色后的颗粒在芯片中的轨迹)

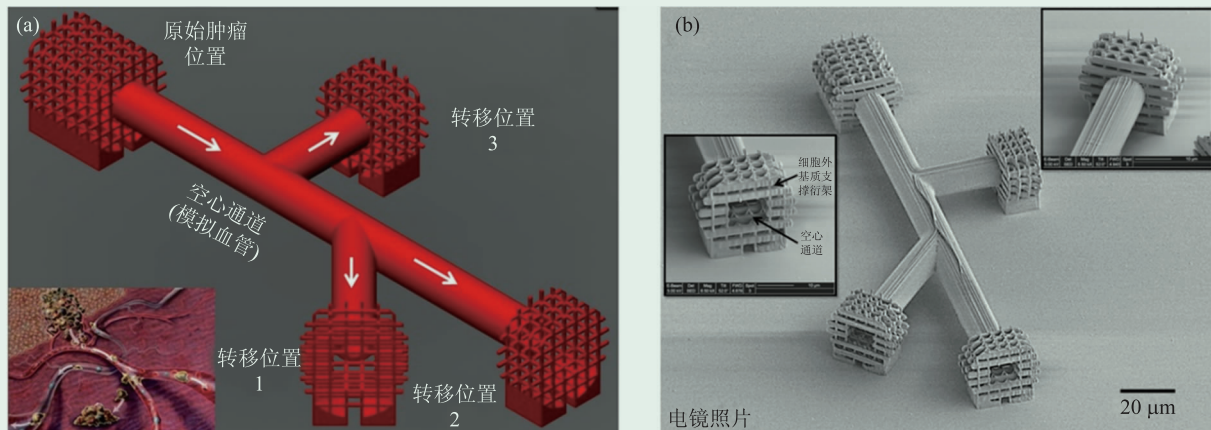


图7 仿血管微结构 (a)计算机辅助设计出的癌细胞转移模型支架;(b)SEM照片显示由飞秒激光三维直写系统加工出的由生物兼容性光刻胶构成的三维模型具备很高的精度

通过激光直写系统所加工出的转移模型图像，可以看到，双光子激光直写系统以及Ormocomp光刻胶具备的高加工精度，可制造出非常精细的三维结构，满足癌细胞三维体外研究的需求。进一步的工作正在进行当中。

5 结束语

虽然利用微流体芯片从全新的生物物理角度理解和研究癌症的工作刚刚揭开序幕，但已经展露出巨大的研究价值和应用潜力。在未来的工作中，我们将继续与癌症生物学家以及医学家一道努力，在物理、生物以及医学更

加融合的基础上对癌症进行更为深入、独到的研究。

致谢 特别感谢美国普林斯顿大学 Robert. H. Austin 教授和 Howard. A. Stone 教授的指导及研究组成员 Bo Sun, Guillaume Duclos, Guillaume Lambert, Kevin Loutharback, Joseph D' Silva 等人在建立癌细胞 3D 转移模型上的密切合作；感谢香港科技大学的曹文彬在循环肿瘤细胞检测实验上的合作；感谢中国科学院物理研究所微加工实验室牟佳佳在飞秒激光三维直写技术上的帮助；感谢中国科学院物理研究所课题组参与本项目的王虎军、朱江瑞和韩伟静的贡献。

参考文献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E *et al.* CA Cancer. J Clin., 2009, 59: 225
- [2] Liu L Y, Loutharback K, Liao D *et al.* Lab. Chip., 2010, 10: 1807
- [3] Liu L Y, Sun B, Aw Yong K *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2011, 108:6853
- [4] Liu L Y, Guillaume D, Sun B *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2013, 10:1073
- [5] Anderson A R, Weaver A M, Cummings P T *et al.* Cell, 2006, 127:905
- [6] Hoenigman R, Bradley E, Lim A. Complexity, 2011, 17:39
- [7] Loutharback K, D'Silva J, Liu L Y *et al.* AIP. Advances, 2012, 2:042107
- [8] Huang L R, Cox E C, Austin R H *et al.* Science, 2004, 304:987