

### 3.3 结果与讨论

#### 3.3.1 液滴微流控芯片设计说明

本章实验中的微流控芯片采用两层设计，包含三个主要功能单元：位于芯片下层的 T 形液滴生成器，位于芯片上层的液滴浮力捕获阵列和楔形通道线虫固定阵列，可以顺序完成液滴生成、线虫包裹、液滴捕获和线虫固定等功能，实现对神经毒素诱导下单个线虫的运动行为和荧光特征的连续监测。其中，T 形液滴生成器的设计与上一章类似；而液滴浮力捕获阵列采用新型设计，并与一个楔形通道线虫固定阵列集成，用于进行连续的液滴捕获和线虫固定。下面将从液滴浮力捕获阵列和楔形通道阵列这两方面对芯片设计加以说明。

##### 3.3.1.1 基于浮力原理的液滴捕获阵列的设计说明

在本章中，我们设计了一种新型的基于浮力原理的液滴捕获方法，使液滴捕获器之间相对独立，在集成线虫固定通道阵列后也不会影响液滴捕获的效果。而如果沿用上一章中利用基于阻力的液滴捕获方式，由于其完全依赖于对通道尺寸及其串并联关系的精确设计，在集成线虫固定通道阵列后，将会改变液滴捕获通道之间的几何关系，难以实现液滴的捕获。

实验中使用的油相，我们用 FC-40（氟碳油）代替了十六烷（烃油），原因在于[17]：（一）FC-40 的密度（ $1.855 \text{ g ml}^{-1}$ ）比水大，可以利用液滴在油相内受到的浮力对其进行捕获；（二）与烃油相比，氟碳油具有良好的气体溶解性，可以为包裹在液滴内的线虫提供充足的氧气供给；（三）与烃油相比，氟碳油不易引起 PDMS 材料的溶胀；（四）FC-40 的生物相容性已经被充分验证，并广泛应用于生物学研究中。此外，我们采用了 RainDance 公司 (MA, USA)

惠赠的氟化表面活性剂 EA (2% w/v) 作为油相的表面活性剂[18], 用于降低水油两相的界面张力, 稳定液滴并防止液滴间的融合。

该设计所采用的液滴浮力捕获原理为: 由于水油两相具有不同密度, 处于油相中的液滴受到向上的浮力, 当液滴流经空的捕获器下方时将向上运动而被捕获于上层捕获器中。具体的液滴捕获步骤如下: (1) T 形交汇处生成的液滴在注射泵推动下沿下层疏运通道向前流动; (2) 当一个液滴流经空的捕获器下方时, 在浮力作用下向上运动并被捕获于上层捕获器中; (3) 后续液滴从这个捕获器下方的输运通道流过, 由于表面活性剂的作用不与已捕获液滴发生融合并被顺序捕获于后面的捕获器中。下图 3-7 为捕获步骤示意图。

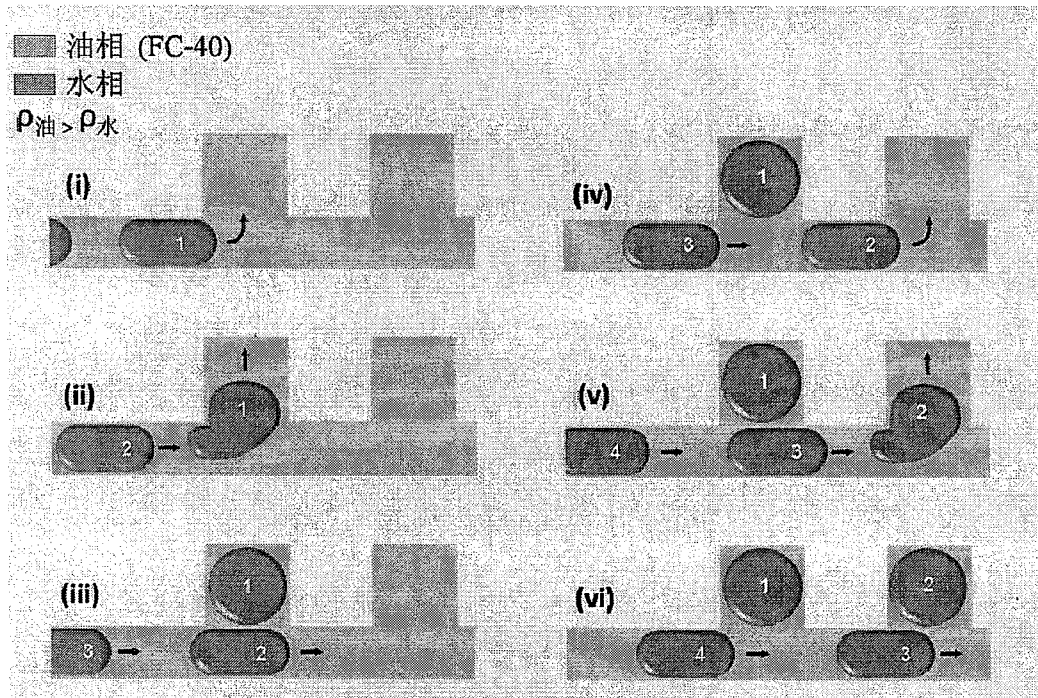


图 3-7 基于浮力原理的液滴捕获步骤示意图。

Fig. 3-7 Schematic illustrations of the floatage-based droplet trapping.

### 3.3.1.2 用于固定线虫的楔形通道阵列的设计说明

为了实现对液滴内包裹线虫的固定及荧光成像，我们在 Hulme 等人以前报道工作[19]的基础上，设计了一个与液滴捕获阵列相邻的楔形通道阵列，用以限制线虫在通道液体内的运动。线虫成虫的身体呈长约 1 mm 的圆柱体，头部和尾部呈锥形，身体中段（最宽处）直径约为 50-60  $\mu\text{m}$ ；而阵列中的楔形通道高 50  $\mu\text{m}$ ，长 2 mm，宽度由 100  $\mu\text{m}$  逐渐缩小至 40  $\mu\text{m}$ （见图 3-8a）。利用液流将线虫输运至楔形通道内，线虫将被卡在通道横截面与其相当的位置（见图 3-8b），其运动将被通道壁所限制从而达到固定的目的。楔形通道末端通向废液池 2 的部分深为 25  $\mu\text{m}$ ，可以有效地将线虫堵截在楔形通道内，防止其因所受压力过大或尺寸略小而流出楔形通道。

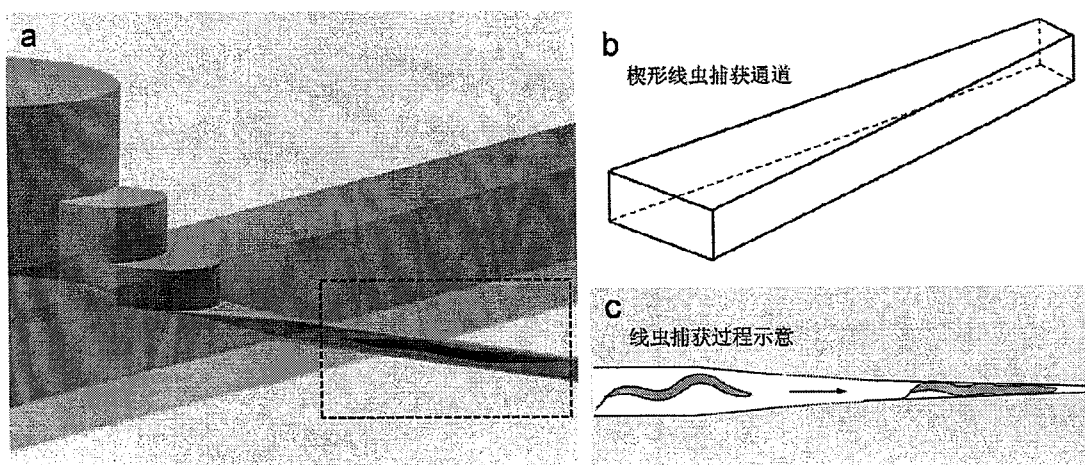


图 3-8 (a) 线虫被固定于楔形通道内的原理示意图；(b) 楔形线虫固定通道设计示意图；(c) 线虫固定过程示意图。

Fig. 3-8 (a) Schematic of an individual *C. elegans* being immobilized in the tapered channel; (b) Illustration of the tapered worm immobilization channel; (c) schematic of worm immobilization process.

楔形通道与捕获器的高度分别为 50  $\mu\text{m}$  和 1000  $\mu\text{m}$ ，二者相差悬殊，如果直接将楔形通道与捕获器相连接，很难使液滴内的线虫进入楔形通道。为了解决这个问题，我们设计了一个阶梯状的结构作为楔形通道与捕获器之间的过渡，采用多次甩胶—曝光的方法制作该结构的 SU-8 模板，最终得到了具有 25  $\mu\text{m}$ -50  $\mu\text{m}$ -200  $\mu\text{m}$ -500 $\mu\text{m}$ -1000  $\mu\text{m}$  的阶梯状高度的通道，完成了楔形通道与捕获器之间的有效连接。

### 3.3.2 液滴微流控芯片的条件优化与性能考察

在进行微流控芯片上的线虫运动行为和荧光特征研究之前，首先需要对实验条件进行优化，并对芯片上的各个功能单元的性能进行考察，以确保各项操作得到预期结果。在上一章中，以下问题已经得到证实：利用 T 形液滴生成器可以产生液滴和包裹线虫；液滴包裹和液滴捕获过程对线虫无明显损伤；液滴微环境对线虫无明显影响。因此在这一部分，我们需要考察或者优化的问题包括流速条件优化、液滴捕获阵列性能考察、线虫悬液密度优化、FC-40 和液滴微环境对线虫生物相容性的考察、以及线虫固定阵列性能考察。

#### 3.3.2.1 液滴产生—流速条件优化

在液滴产生部分，由于在本章实验中采用了与上一章相同的 T 形液滴生成器结构，其形成液滴的性能已经验证，因此只需对其形成液滴的流速条件进行优化。

本章实验中所采用的液滴捕获器的形状为高 1 mm、直径 1 mm 的圆柱体，适合其大小的液滴体积应近似于直径 1 mm 的球体（约 0.5  $\mu\text{L}$ ）。为了获得合适液滴的尺寸(0.5  $\mu\text{L}$ )，我们在实验中对油水两相的流速进行了优化，并最终确定了最佳的流速条件：油相为 5.21  $\mu\text{L min}^{-1}$ ，水相为 1.74  $\mu\text{L min}^{-1}$ 。以绿色墨水溶液为水相，以 FC-40 (2% w/v EA) 为油相，将二者分别以 5.21  $\mu\text{L min}^{-1}$

和  $1.74 \mu\text{L min}^{-1}$  的流速通过注射泵注入芯片中，可以观察到在两个相互垂直进样通道的 T 型交汇处产生连续的单分散性水相微液滴，产生 80 个微液滴的时间约为 20 分钟。图 3-9 是对液滴生成过程的视频截图。

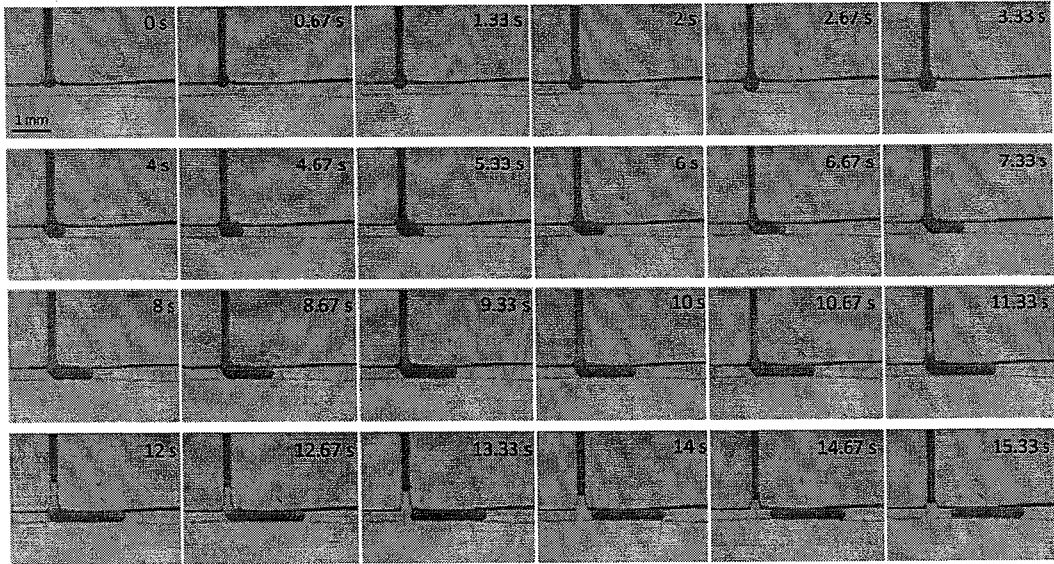


图 3-9 T 形液滴生成器处的水相液滴生成过程。(油相流速  $5.21 \mu\text{L min}^{-1}$ ，水相流速  $1.74 \mu\text{L min}^{-1}$ 。)

Fig. 3-9 A series of images showing the generation process of a droplet.

### 3.3.2.2 液滴捕获——基于浮力原理的液滴捕获阵列性能考察

在微流控芯片中，按油相  $5.21 \mu\text{L min}^{-1}$  和水相  $1.74 \mu\text{L min}^{-1}$  的流速条件生成单分散性液滴；产生的液滴向前流动，进入下游的液滴捕获阵列，并在浮力作用下被依次捕获于上层的液滴捕获器中。当完成 80 个液滴的产生后，关停水相注射泵，剩余液滴在油相注射泵推动下继续流动并被全部捕获；完成整个捕获过程（从第一个液滴产生到最后一个液滴被捕获）的时间约为 30 分钟。图 3-10 是对液滴浮力捕获过程的视频截图，捕获过程与理论设计的步

骤一致；图 3-11 显示了捕获有 80 个墨水液滴的微流控芯片照片，说明芯片上的液滴浮力捕获阵列的实际性能满足其设计的预期效果。

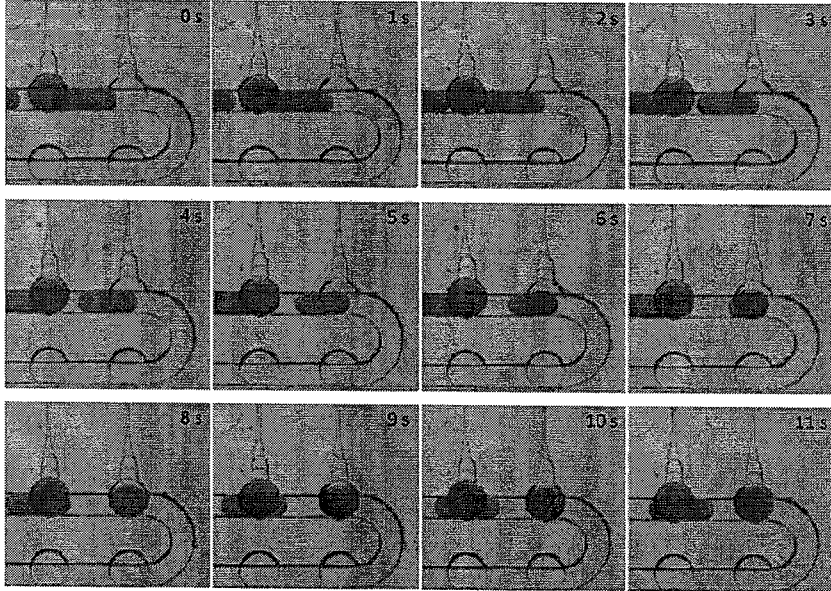


图 3-10 基于浮力的液滴捕获过程。

Fig. 3-10 A series of images showing the trapping process of an ink droplet.

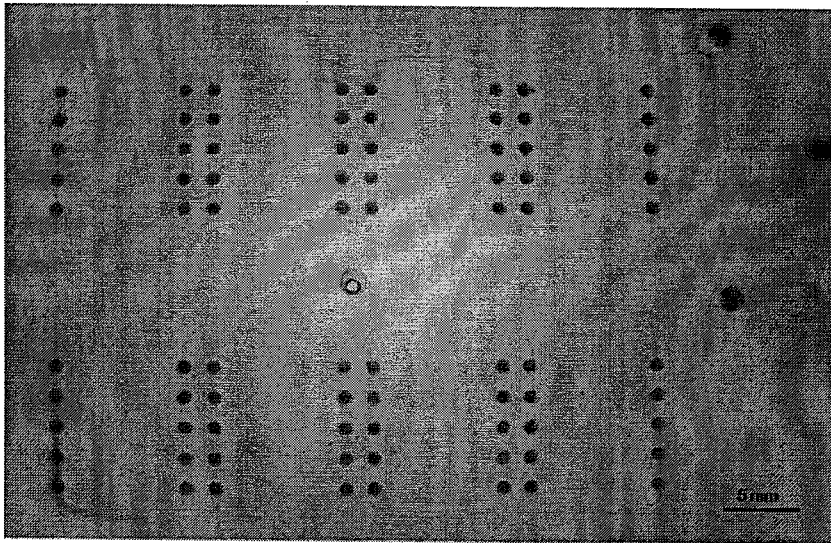


图 3-11 捕获有 80 个墨水液滴的微流控芯片照片

Fig. 3-11 Photograph of the microfluidic chip trapped with 80 ink droplets.

### 3.3.2.3 线虫包裹

在线虫包裹部分，由于本章实验中采用了与上一章相同的 T 形液滴生成器，其包裹线虫的性能已经得到验证。因此此处只需对线虫悬液的密度进行优化，并对 FC-40 及液滴微环境对线虫的生物相容性进行考察。

#### 3.3.2.3.1 线虫悬液密度优化

在油相  $5.21 \mu\text{L min}^{-1}$  和水相  $1.74 \mu\text{L min}^{-1}$  的流速条件下，我们最终将线虫悬液的密度确定在  $2 \mu\text{L}^{-1}$ ，此时单个线虫的成功包裹率最高可达 50%。图 3-12 显示了捕获有 80 个包裹线虫的液滴的微流控芯片。图 3-13 为对液滴包裹单个线虫过程的视频截图，图 3-14 为对包裹有单个线虫的液滴捕获过程的视频截图，

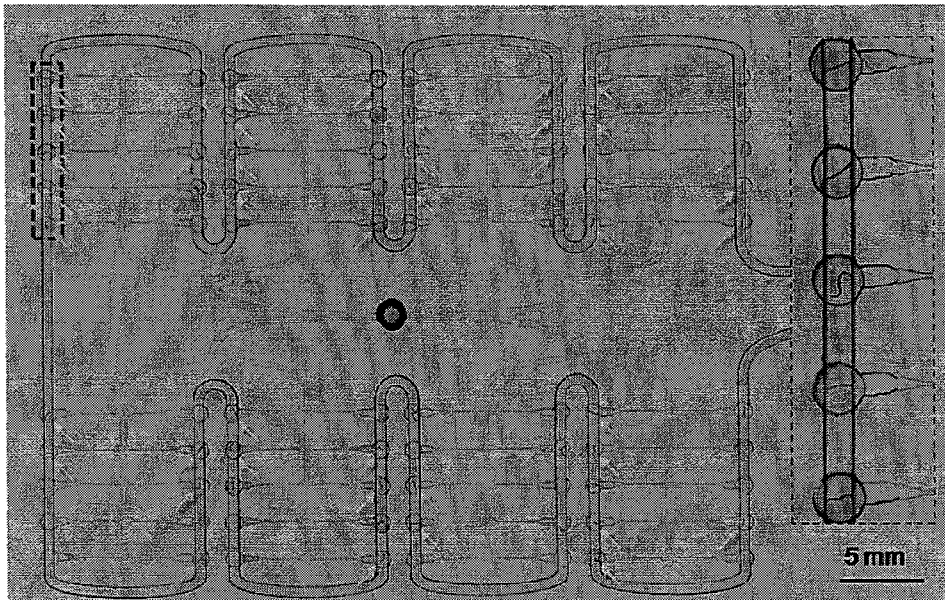


图 3-12 捕获有 80 个包裹线虫液滴的微流控芯片图，其中黄色箭头指示了被成功包裹的单个线虫的位置。

Fig. 3-12 Image of 80 droplets encapsulated with worms, and the yellow arrows indicate the positions of the encapsulated individual worms.

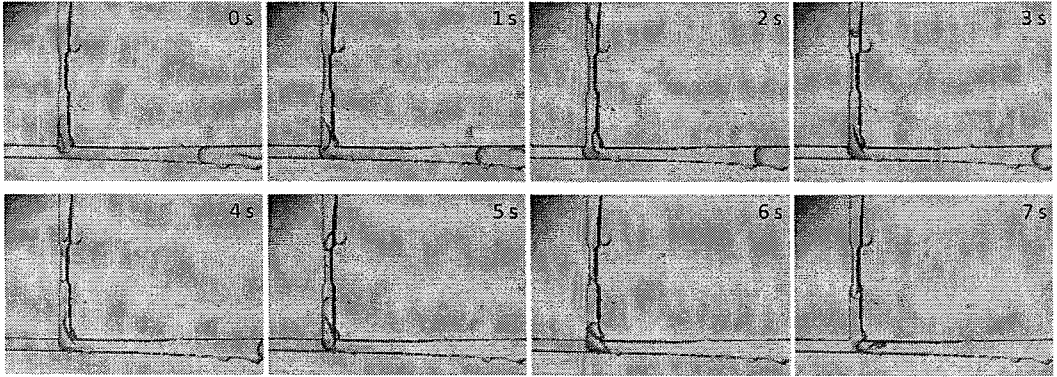


图 3-13 T 形液滴生成器处的液滴包裹单个线虫过程。

Fig. 3-13 A series of images showing the individual worm encapsulating process.

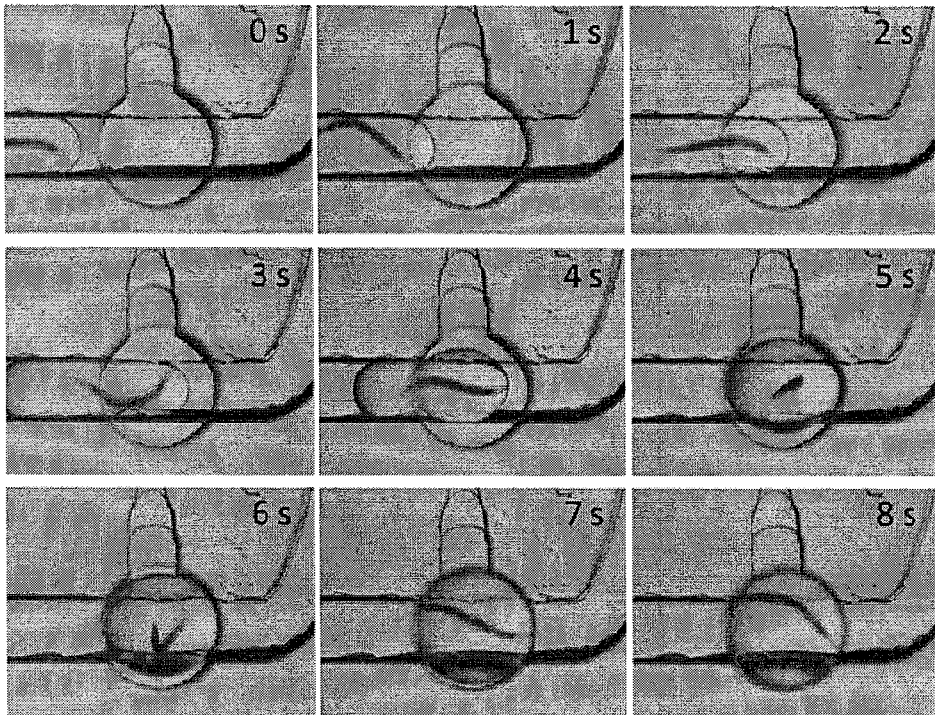


图 3-14 基于浮力原理的包裹有单个线虫液滴的捕获过程。

Fig. 3-14 A series of images showing the trapping process of a droplet encapsulated with a individual worm.

## 3.3.2.3.2 FC-40 和液滴微环境对线虫生物相容性的考察

为了确定 FC-40 (2% w/v EA) 和液滴微环境对单个线虫 (包括成虫和 L1 期幼虫) 的影响, 我们分别对包裹于油相内液滴中的 18 只 L1 期幼虫和 24 只线虫成虫进行了 4~5 天的长时间观测, 用 CCD 对这些单个线虫每天的生存状态进行记录。结果显示: (一) 全部 L1 期幼虫可以在油相内液滴中 (无食物和排泄物交换) 存活至少 5 天, 期间线虫的运动状态基本正常; (二) 绝大多数成虫在 4 天内保持存活状态并可以产卵, 且卵能正常孵化。下图 3-15a 为包裹于液滴内的单个线虫成虫在 4 天内的存活情况, 在第 4 天仍有 75% 的线虫存活; 图 3-15b 为包裹于液滴内的线虫成虫在 4 天内的生存状态, 可以清楚地看到该线虫的产卵和卵孵化成幼虫的情况。上述结果表明, FC-40 (2% w/v EA) 和液滴微环境对单个线虫在 4~5 天内的生存状态无明显影响; 由于正式实验的持续时间不超过 2 小时, 可以认为在实验过程中 FC-40 (2% w/v EA) 和液滴微环境不会使线虫出现显著的应激状态, 以 FC-40 (2% w/v EA) 为油相的液滴微流控芯片作为线虫研究的平台是可行的。

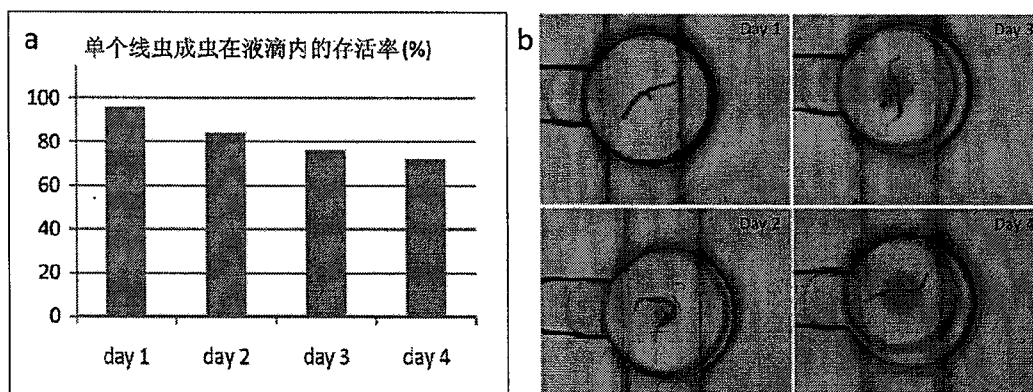


图 3-15 FC-40 和液滴微环境在 4 天内对线虫成虫生存状态的影响考察。

(a) 单个线虫成虫在液滴内的存活率; (b) 线虫成虫在液滴内的生存状态。

Fig. 3-15 Characterization of the effects of FC-40 and droplet microenvironment on the survival status of adult worms. (a) Survival rate of adult

worms encapsulated in droplets in 4 days; (b) living status of an adult worm encapsulated in droplet.

### 3.3.2.4 线虫固定—楔形通道阵列性能考察

在完成对包裹在液滴内单个线虫的运动行为采集后,按§3.2.3中所述方法将1%的琼脂糖溶液以 $0.5-1.0\ \mu\text{L}\ \text{s}^{-1}$ 的流速注入芯片。此时被捕获的液滴会在琼脂糖溶液的推动下从捕获器中释放出来,而液滴内的线虫将随着液滴一起进入相邻的楔形通道,并被固定在通道横截面与其宽度相当的位置。图3-16显示了被固定线虫的头部荧光照片,神经元清晰可分辨。图3-17a是对线虫固定过程的视频截图,捕获过程与理论设计的步骤一致;图3-17b和3-17c分别显示了8只线虫被固定在楔形通道阵列内的明场和荧光照片。以上结果说明芯片上的液滴浮力捕获阵列的实际性能满足其设计的预期效果。

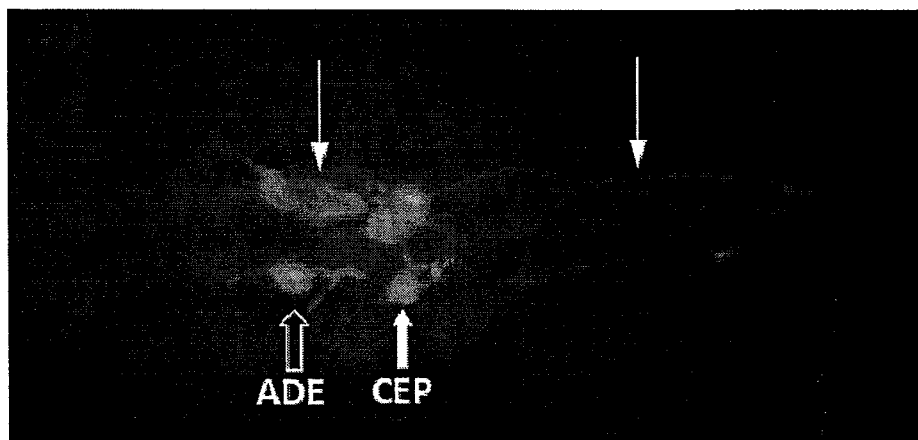


图 3-16 被楔形通道固定的 UA57 线虫头部荧光照片。粗体箭头指示了 2 个 ADE 和 4 个 CEP 神经元胞体的位置;细箭头指示了神经元突触位置。

Fig. 3-16 An enlarged fluorescence image of a UA57 worm with six DAergic neurons in the head. The white arrows indicate the cell bodies of two ADE and four CEP, and the thin arrows identify CEP and ADE processes.

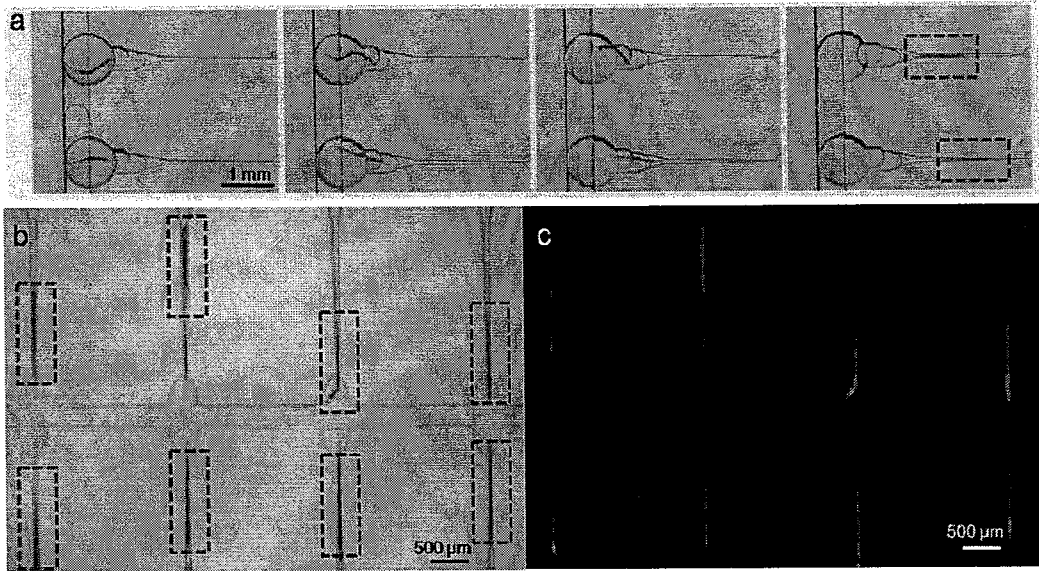


图 3-17 (a) 液滴释放与线虫固定过程；(b, c) 8 只被固定在楔形通道阵列内的线虫的明场和荧光照片。

Fig. 3-17 (a) A series of images showing the immobilizing process of a individual worm; (b, c) bright field image and fluorescence image of eight worms immobilized in the tapered channel array, respectively.

以上实验结果证实了该微流控芯片具有以下功能：（一）可以利用 T 形液滴液滴生成器连续产生的水相液滴包裹单个线虫成虫；（二）可以利用基于浮力的液滴捕获阵列捕获液滴，继而对包裹其中的线虫的运动行为进行记录和分析，所使用的油相和液滴微环境对线虫的生存状态无显著影响；（三）在运动行为记录完成后，可以利用楔形通道阵列固定包裹在液滴内的线虫，继而对其荧光特征进行成像分析。

该微流控芯片平台的创新性在于：（一）首次提出了一种全新的基于浮力原理的液滴捕获方式，为微流控芯片上的液滴捕获提供了一个设计更加简便、效果更加稳定的新方法；（二）首次实现了液滴微流控芯片上对通量化单个线

虫的运动行为和荧光成像的连续监测，且实验操作自动、便捷，运行通量较高。

与常规的线虫生物学研究方法相比，该平台具有以下优势：（一）微流控液滴的尺寸灵活可控，可以满足线虫生长发育中的各种尺寸需要；（二）利用微流控液滴作为单个线虫的存储器，可以限制线虫的运动范围，使行为采集过程无需人工监控，且一次采集可以得到多个单线虫的行为信息；（三）可以自动、快速、连续地实现对高通量单个线虫的多种操控（如包裹、运输、固定等）。

接下来，我们在该平台上开展了对线虫帕金森病模型的运动行为缺陷、多巴胺能神经元变性以及氧化应激水平的研究。

### 3.3.3 对线虫帕金森病药理学模型的研究

神经毒素 6-OHDA 可以通过诱导多巴胺神经元变性使脊椎动物出现帕金森病症状，已被广泛应用于建立帕金森病动物模型和评价筛选抗帕金森药物的研究中。虽然帕金森病的病理已逐渐被人们所认识，但关于多巴胺能神经元发生变性的原因，至今仍未有明确的说法。越来越多的研究成果表明，氧化应激在帕金森病的形成中发挥了重要作用。

在下面的工作中，我们在液滴微流控芯片平台上研究了线虫帕金森病模型的运动缺陷行为、多巴胺能神经元变性情况和体内氧化应激水平，以期找到帕金森病的症状表现、病理表现与氧化应激因素之间的关系。所采用的转基因虫株为 UA57 (baIn4[Pdat-1::GFP + Pdat-1::CAT-2]) 和 CL2166 (dvIs19[pAF15(gst-4::GFP::NLS)])；其中，UA57 线虫可以在体内的 8 个多巴胺能神经元中表达特异性绿色荧光蛋白，而 CL2166 线虫可以表达由氧化应激诱导的绿色荧光蛋白。

### 3.3.3.1 运动行为缺陷

由于体内多巴胺能神经元的缺失, 帕金森病患者通常会表现出一系列的运动缺陷, 例如静止性震颤、肌强直、运动迟缓和姿势步态障碍等。为了检测由 6-OHDA 诱导产生的线虫 (UA57 和 CL2166) 运动缺陷, 分别对线虫施加 0, 5, 10 mM 6-OHDA 的作用, 然后将每种 6-OHDA 浓度条件下的线虫均分为三组, 并在成虫的第 1, 3, 5 天注入芯片进行检测 (具体操作步骤见 §3.2.4.2)。

#### 3.3.3.1.1 转基因虫株 UA57 的运动行为缺陷

每种条件下, 对随机挑选的 12 只包裹于液滴内的单个线虫 (UA57) 进行 1 h 内的运动行为采集, 并对线虫表现出的不同运动形态进行分析。通过采集到的视频可以发现, 对照组 (0 mM 6-OHDA) 线虫在检测时间范围内均呈现出自由运动形态 (较高运动活性, 摆动频率较快, 且多为正弦形或 C 形摆动); 而在经过 6-OHDA 作用后, 线虫呈现出明显的运动缺陷 (如摆动缓慢, 更多僵直或  $\Omega$  形态等)。

对在不同检测时间 (第 1、3、5 天)、不同浓度 6-OHDA (0, 5, 10 mM) 诱导下的线虫 (UA57) 在 1 h 之内的摆动频率进行人工计数, 对所得数据进行统计, 并按线虫摆动频率与 6-OHDA 剂量和检测时间的关系进行整理。所得的不同检测时间、不同浓度 6-OHDA 诱导下的单个线虫摆动频率-时间关系图见图 3-18, 由图可以看出 UA57 单个线虫的摆动频率变化。(一) 对照组单个线虫的摆动频率相对较高 (最高  $\sim 5.5 \text{ s}^{-1}$ , 大体分布  $3 \sim 5 \text{ s}^{-1}$ ), 且在检测的时间范围内 (第 1, 3, 5 天) 没有明显的变化; 稀有线虫出现摆动频率为 0 的情况。(二) 在 5 mM 6-OHDA 作用后, 第 1 天单个线虫的摆动频率与对照组相近 (最高  $\sim 5.5 \text{ s}^{-1}$ , 大体分布  $3 \sim 5 \text{ s}^{-1}$ ), 第 3, 5 天线虫的摆动频率有所

下降(最高 $\sim 5\text{ s}^{-1}$ , 大体分布 $0\sim 4.5\text{ s}^{-1}$ ), 且出现 $0$  摆动频率的线虫数目增多, 占全部线虫的 $1/3\sim 1/2$ 。(三) 在 $10\text{ mM}$   $6\text{-OHDA}$  作用后, 第 $1$  天线虫的摆动频率就变得比较低(最高 $\sim 4.5\text{ s}^{-1}$ , 大体分布 $0\sim 4\text{ s}^{-1}$ ),  $1/3$  线虫呈现 $0$  摆动频率; 第 $3, 5$  天线虫的摆动频率继续下降(最高 $\sim 3.5\text{ s}^{-1}$ , 大体分布 $0\sim 3\text{ s}^{-1}$ ),  $0$  摆动频率的线虫数目继续增多, 占全部线虫的 $1/2\sim 2/3$ 。

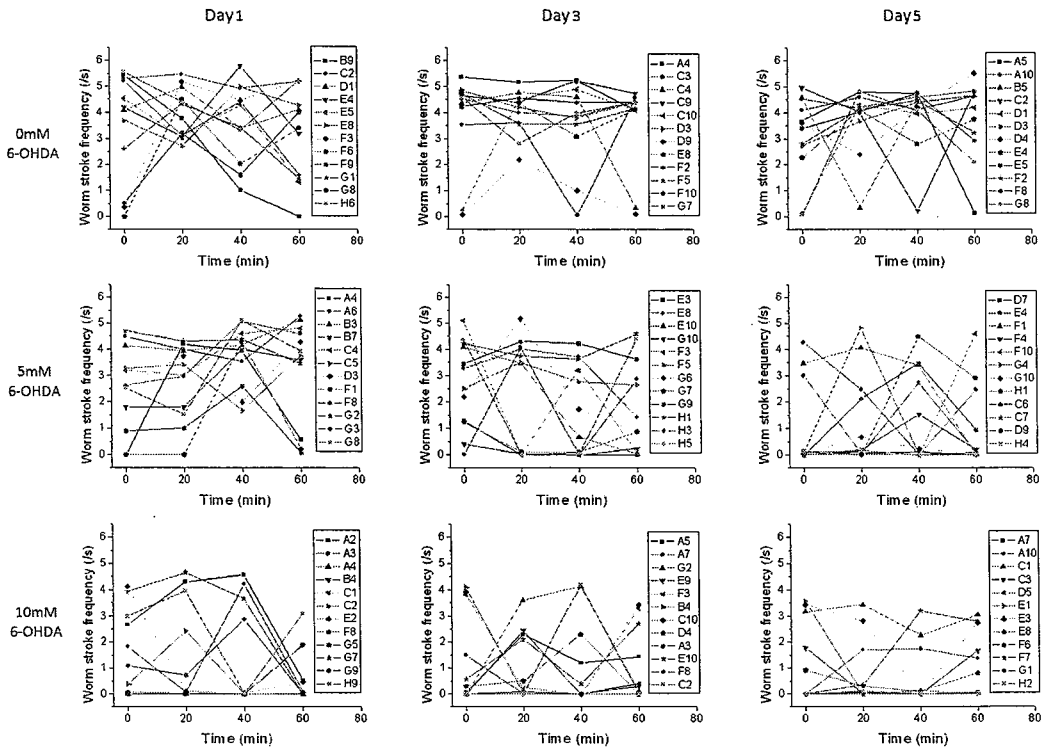


图 3-18 不同检测时间、不同浓度  $6\text{-OHDA}$  诱导下的 UA57 单个线虫摆动频率变化。

Fig. 3-18 Stroke frequencies of 12 individual UA57 worms after  $6\text{-OHDA}$  treatment.

对 UA57 单个线虫在不同条件下的摆动频率进行平均统计 (表 3-2), 所得的同一检测时间下线虫平均摆动频率- $6\text{-OHDA}$  作用浓度关系图见图 3-19a,

相同浓度的 6-OHDA 作用下线虫平均摆动频率-检测时间关系图见图 3-19b。从相同检测时间不同 6-OHDA 作用浓度以及相同 6-OHDA 作用浓度不同检测时间两个方面分别对结果加以分析。由图 3-19a 可知, 在成虫第一天, 10 mM 6-OHDA 作用下的线虫摆动频率 ( $1.19 \text{ s}^{-1}$ ) 明显低于对照组 ( $3.58 \text{ s}^{-1}$ ) 和 5 mM 作用组 ( $3.11 \text{ s}^{-1}$ ); 在成虫第三天, 对照组线虫的摆动频率维持原水平 ( $3.79 \text{ s}^{-1}$ ), 5 mM 6-OHDA 作用下的线虫摆动频率降至  $2.13 \text{ s}^{-1}$ , 10 mM 6-OHDA 作用下的线虫摆动频率与第一天相比也略有下降 ( $1.03 \text{ s}^{-1}$ ), 三者之间均存在显著性差异; 在成虫第五天, 对照组线虫的摆动频率水平仍旧不变 ( $3.64 \text{ s}^{-1}$ ), 5 mM 6-OHDA 作用下的线虫摆动频率则降至与 10 mM 作用组相同水平, 二者分别为  $1.11 \text{ s}^{-1}$  和  $0.87 \text{ s}^{-1}$ , 均与对照组存在显著性差异。由图 3-19b 可知, 无 6-OHDA 作用下 (对照组), 在第 1, 3, 5 天, 线虫的摆动频率均保持较高水平, 三者之间无显著性差异; 在 5 mM 6-OHDA 作用下, 线虫的摆动频率在第一天较高 ( $3.11 \text{ s}^{-1}$ ), 在第三天有所下降 ( $2.13 \text{ s}^{-1}$ ), 在第五天明显下降 ( $1.11 \text{ s}^{-1}$ ); 在 10 mM 6-OHDA 作用下, 线虫在第一天就出现了较低的摆动频率 ( $1.19 \text{ s}^{-1}$ ), 与第三天 ( $1.03 \text{ s}^{-1}$ ) 和第五天 ( $0.87 \text{ s}^{-1}$ ) 相比无明显差异。

| 6-OHDA 浓度<br>检测时间 | 0 mM | 5 mM | 10 mM |
|-------------------|------|------|-------|
| 第 1 天             | 3.58 | 3.11 | 1.19  |
| 第 3 天             | 3.79 | 2.13 | 1.03  |
| 第 5 天             | 3.64 | 1.11 | 0.87  |

表 3-2 UA57 单个线虫在不同检测时间 (第 1, 3, 5 天) 和不同 6-OHDA 作用浓度 (0, 5, 10 mM) 下的平均摆动频率数据。

Table 3-2 Average stroke frequency of individual UA57 worms treated with different concentrations of 6-OHDA (0, 5, 10 mM) at different detection time (day 1, 3, 5).

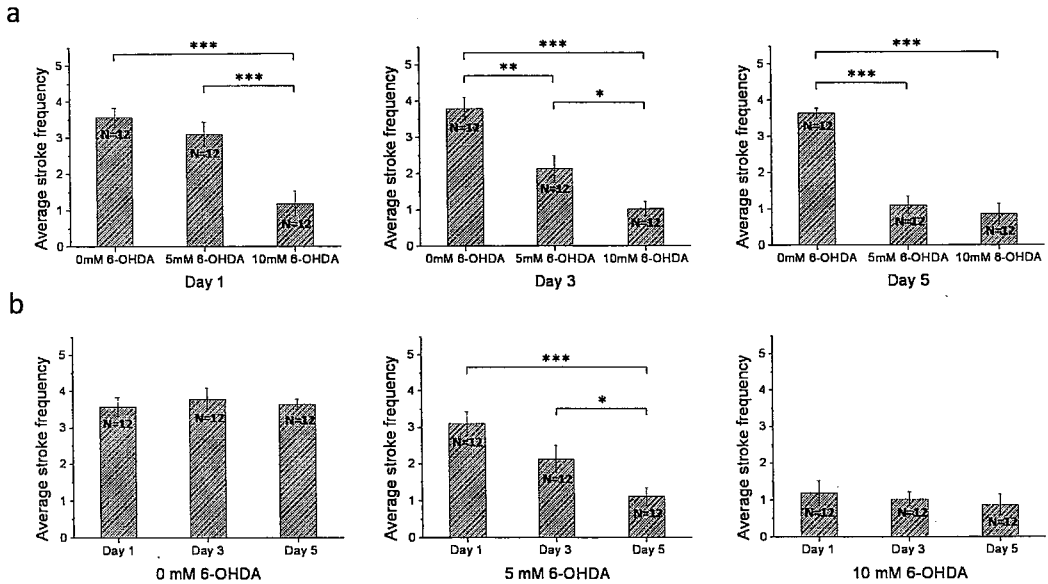


图 3-19(a) 不同检测时间下, UA57 单个线虫的平均摆动频率与 6-OHDA 作用浓度关系图; (b) 不同 6-OHDA 作用浓度下, UA57 单个线虫的平均摆动频率与检测时间关系图。(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

Fig. 3-19 (a) Average stroke frequency of individual UA57 worms as a function of 6-OHDA concentration at different detection times (day 1, 3, 5); (b) Average stroke frequency of individual UA57 worms as a function of detection time at different 6-OHDA concentrations (0, 5, 10 mM), \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### 3.3.3.1.2 转基因虫株 CL2166 线虫的运动行为缺陷

每种条件下, 对随机挑选的 12 只包裹于液滴内的单个线虫 (CL2166) 进行 1 h 内的运动行为采集, 并对线虫表现出的不同运动形态进行分析。通过采集到的视频可以发现, 对照组 (0 mM 6-OHDA) 线虫在检测时间范围内

均呈现出自由运动形态（较高运动活性，摆动频率较快，且多为正弦形或 C 形摆动）；而在经过 6-OHDA 作用后，线虫呈现出明显的运动缺陷（如摆动缓慢，更多僵直或  $\Omega$  形态等）。

对在不同检测时间（第 1、3、5 天）、不同浓度 6-OHDA（0, 5, 10 mM）诱导下的线虫（CL2166）在 1 h 之内的摆动频率进行人工计数，对所得数据进行统计，并按线虫摆动频率与 6-OHDA 剂量和检测时间的关系进行整理。所得的不同检测时间、不同浓度 6-OHDA 诱导下的单个线虫摆动频率-时间关系图见图 3-20，由图可以看出 CL2166 单个线虫的摆动频率变化。（一）对照组单个线虫的摆动频率相对较高（最高 $\sim 4.5\text{ s}^{-1}$ ），且在检测的时间范围内（第 1, 3, 5 天）没有明显的变化；稀有线虫出现摆动频率为 0 的情况。（二）在 5 mM 6-OHDA 作用后，第 1 天单个线虫的摆动频率情况与对照组相近；第 3 天线虫的最高摆动频率有所下降（ $\sim 4\text{ s}^{-1}$ ），且约 1/3 的线虫摆动频率降为 0；第 5 天线虫的最高摆动频率明显下降（ $\sim 2.2\text{ s}^{-1}$ ），且超过 1/2 的线虫出现了摆动频率为 0 的情况。（三）在 10 mM 6-OHDA 作用后，第 1, 3 天线虫的摆动频率已降至相当低的水平（最高 $\sim 3\text{ s}^{-1}$ ，大体分布  $0\sim 2.5\text{ s}^{-1}$ ）；第 5 天，全部线虫的摆动频率均小于  $1\text{ s}^{-1}$ ，且超过 1/2 的线虫出现了摆动频率为 0 的情况。

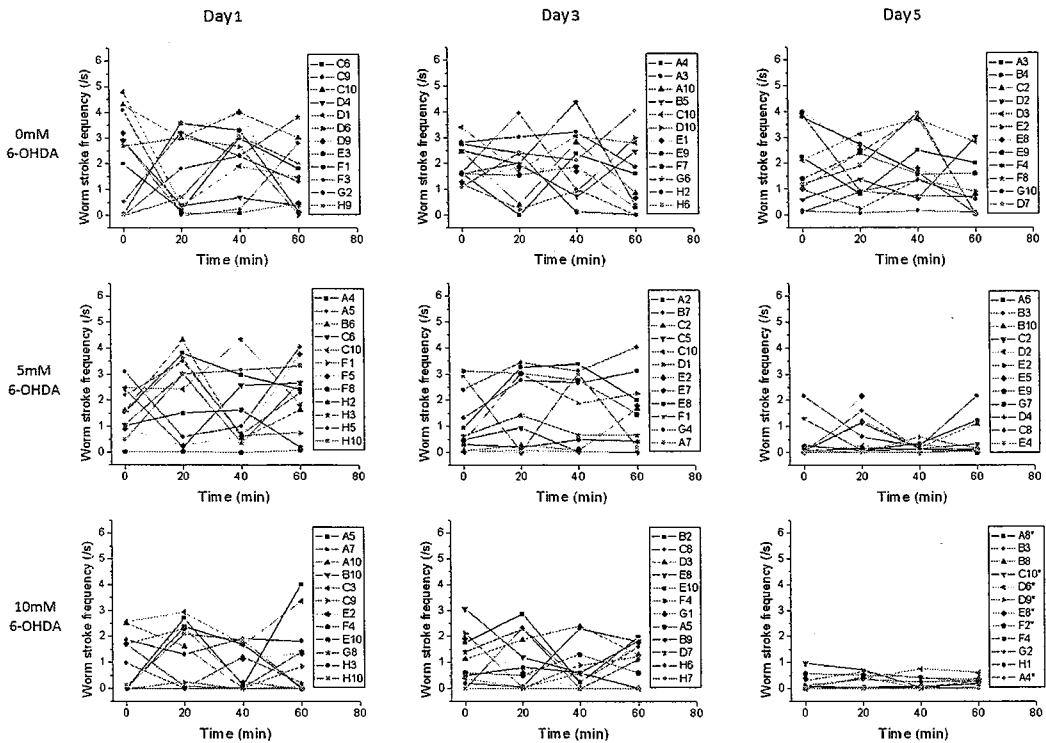


图 3-20 不同检测时间、不同浓度 6-OHDA 诱导下的 CL2166 单个线虫摆动频率变化。

Fig. 3-18 Stroke frequencies of individual CL2166 worms after 6-OHDA treatment.

对 CL2166 单个线虫在不同条件下的摆动频率进行平均统计 (表 3-3), 所得的相同检测时间下线虫平均摆动频率-6-OHDA 作用浓度关系图见图 3-21(a), 相同 6-OHDA 作用浓度下线虫平均摆动频率-检测时间关系图见图 3-21(b)。我们从相同检测时间不同 6-OHDA 作用浓度以及相同 6-OHDA 作用浓度不同检测时间这两个方面分别对结果加以分析。由图 3-21(a)可知, 在成虫第一天, 10 mM 6-OHDA 作用下的线虫摆动频率 ( $1.08 \text{ s}^{-1}$ ) 明显低于对照组 ( $1.91 \text{ s}^{-1}$ ) 和 5 mM 作用组 ( $1.85 \text{ s}^{-1}$ ); 在成虫第三天, 5 mM 6-OHDA 作

用下的线虫摆动频率有所下降 ( $1.40 \text{ s}^{-1}$ ), 但与对照组没有形成显著差异,  $10 \text{ mM}$  6-OHDA 作用下的线虫摆动频率保持较低水平 ( $1.00 \text{ s}^{-1}$ ), 与对照组之间存在显著性差异; 在成虫第五天,  $5 \text{ mM}$  6-OHDA 和  $10 \text{ mM}$  6-OHDA 作用下的线虫摆动频率都降至很低的水平, 分别为  $0.40 \text{ s}^{-1}$  和  $0.22 \text{ s}^{-1}$ , 与对照组均存在显著性差异。由图 3-21(b)可知, 无 6-OHDA 作用下(对照组), 在第 1, 3, 5 天, 线虫的摆动频率均保持较高水平, 三者之间无显著性差异; 在  $5 \text{ mM}$  6-OHDA 作用下, 线虫的摆动频率在第一天仍较高 ( $1.85 \text{ s}^{-1}$ ), 在第三天有所下降 ( $1.40 \text{ s}^{-1}$ ), 但与第一天没有形成显著差异, 在第五天明显降至很低的  $0.40 \text{ s}^{-1}$ , 与第一、三天都有显著性差异; 在  $10 \text{ mM}$  6-OHDA 作用下, 线虫在第一天就出现了较低的摆动频率 ( $1.08 \text{ s}^{-1}$ ), 与第三天 ( $1.00 \text{ s}^{-1}$ ) 无明显差别, 在第五天摆动频率降至很低水平 ( $0.22 \text{ s}^{-1}$ ), 与第一、三天都有显著性差异。

| 6-OHDA 浓度<br>检测时间 | 0 mM | 5 mM | 10 mM |
|-------------------|------|------|-------|
| 第 1 天             | 1.91 | 1.85 | 1.08  |
| 第 3 天             | 1.83 | 1.40 | 1.00  |
| 第 5 天             | 1.60 | 0.40 | 0.22  |

表 3-3 CL2166 单个线虫在不同检测时间(第 1, 3, 5 天)和不同 6-OHDA 作用浓度 (0, 5, 10 mM) 下的平均摆动频率数据。

Table 3-3 Average stroke frequency of individual CL2166 worms treated with different concentrations of 6-OHDA (0, 5, 10 mM) at different detection time (day 1, 3, 5).

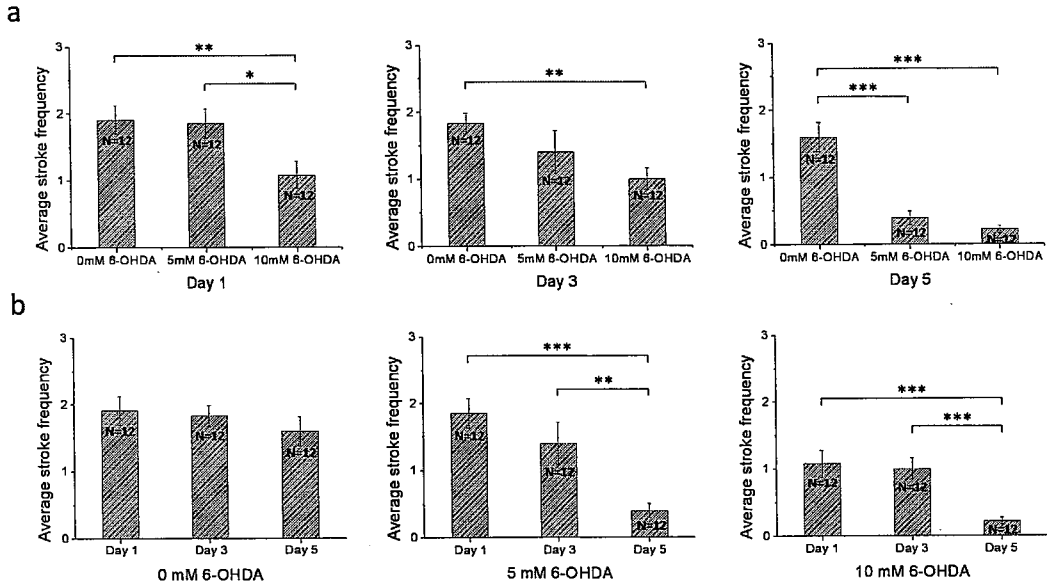


图 3-21 (a) 不同检测时间下, CL2166 单个线虫的平均摆动频率与 6-OHDA 作用浓度关系图; (b) 不同 6-OHDA 作用浓度下, CL2166 单个线虫的平均摆动频率与检测时间关系图。(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

Fig. 3-21 (a) Average stroke frequency of individual CL2166 worms as a function of 6-OHDA concentration at different detection times (day 1, 3, 5); (b) Average stroke frequency of individual CL2166 worms as a function of detection time at different 6-OHDA concentrations (0, 5, 10 mM), \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

综合以上结果可以发现, 神经毒素 6-OHDA 可以诱导线虫产生运动行为缺陷(摆动频率降低); 5 mM 的 6-OHDA 作用, 可以使线虫在成虫第三天之后表现出明显的运动行为缺陷; 而 10 mM 的 6-OHDA 作用, 可以使线虫在成虫第一天就出现明显的运动行为缺陷。

### 3.3.3.2 多巴胺能神经元变性

为了对 6-OHDA 作用所引起的线虫多巴胺能神经元变性进行定量评价, 我们使用转基因株 UA57 线虫 (baIn4[Pdat-1::GFP + Pdat-1::CAT-2]), 它可以在体内的 8 个多巴胺能神经元(包括位于头部的四个 CEP 神经元和两个 ADE 神经元, 以及位于尾部的两个 PDE 神经元) 中表达特异性绿色荧光蛋白。在实验中, 为了清晰的对神经元进行成像, 我们选择了头部的六个多巴胺能神经元进行研究。根据之前对线虫运动缺陷的分析, 在成虫第三天可以反映不同浓度 6-OHDA 对线虫的不同影响程度, 因此本处实验中我们主要研究了成虫第三天时线虫的多巴胺能神经元的变性情况。

在成虫第三天, 在完成对随机挑选的液滴内单个线虫的运动行为数据的采集之后, 按§ 3.2.6 中的方法将这些线虫固定于楔形通道阵列中, 并对受到不同浓度 6-OHDA 作用下的线虫头部多巴胺能神经元进行荧光成像。图 3-22 是分别在不同浓度 6-OHDA 作用后, UA57 单个线虫头部的六个多巴胺能神经元的荧光图像, 可以看出随 6-OHDA 作用浓度的增加, 在线虫多巴胺能神经元所表达的 GFP 强度明显降低。如图所示, 在成虫第三天, 未经 6-OHDA 作用的线虫在六个多巴胺能神经元上表现出了完整而明亮的绿色荧光, 说明其神经元状态正常; 在经 5 mM 6-OHDA 作用后, 线虫多巴胺能神经元所表达的 GFP 强度有所下降, 很多细胞体本身变圆且沿着树突出现了泡状结构, 说明神经元已发生一定程度的变性; 在经 10 mM 6-OHDA 作用后, 线虫多巴胺能神经元所表达的 GFP 强度明显下降, 神经细胞体本身变小变圆或出现了 GFP 缺失, 且树突荧光消失, 说明神经细胞出现明显的变性缺失。以上结果说明, 神经毒素 6-OHDA 会诱导线虫多巴胺能神经元发生变性; 作用的 6-OHDA 浓度升高, 多巴胺能神经元的变性程度也随之升高。

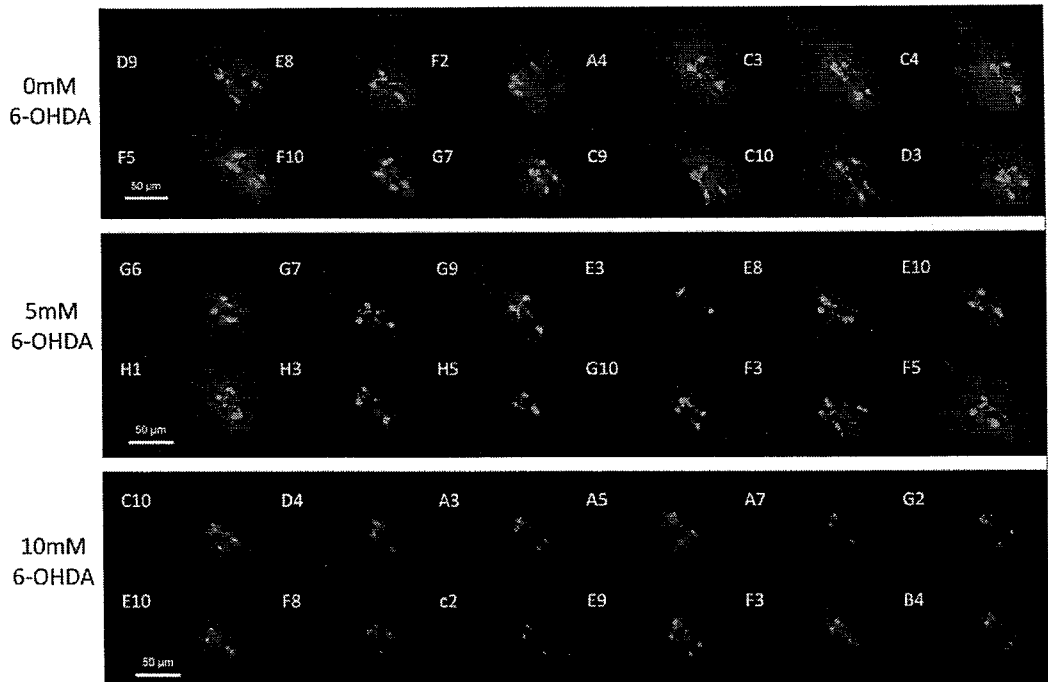


图 3-22 不同浓度 6-OHDA 诱导下, UA57 单个线虫头部的多巴胺能神经元荧光图像。

Fig. 3-22 Fluorescence images of six DAergic neurons of UA57 worms after 6-OHDA treatment of different concentrations.

对 UA57 单个线虫在成虫第三天、不同 6-OHDA 浓度下的体内表达的绿色荧光强度进行平均统计, 所得的平均荧光强度-6-OHDA 作用浓度关系图见图 3-23。如图所示, 在成虫第三天, 随着 6-OHDA 所用浓度的升高, UA57 线虫头部多巴胺能神经元所表达的绿色荧光强度越来越弱; 说明 5 mM 和 10 mM 的 6-OHDA 可以诱导线虫的多巴胺能神经元产生不同程度的变性, 神经元变性程度与 6-OHDA 呈剂量效应。

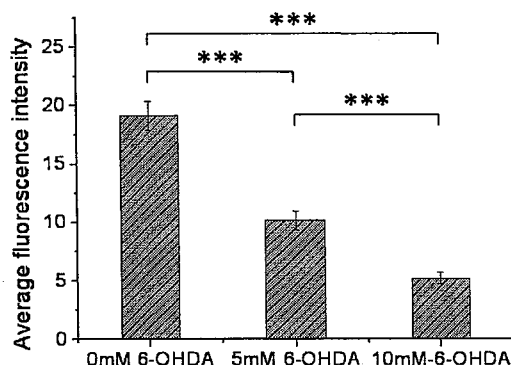


图 3-23 不同浓度 6-OHDA 诱导下, UA57 线虫头部多巴胺能神经元的平均荧光强度。 (\*\*\*) $p < 0.001$ )

Fig. 3-23 Average fluorescence intensity of DAergic neurons of UA57 worms after 6-OHDA treatment of different concentrations, (\*\*\*) $p < 0.001$ .

### 3.3.3.3 氧化应激水平

为了对线虫多巴胺能神经元变性过程中体内的氧化应激水平进行定量评价, 我们使用转基因株 CL2166 线虫 ( $dvIs19[pAF15(gst-4::GFP::NLS)]$ ), 它可以表达由体内的氧化应激诱导的绿色荧光蛋白。在本处实验中主要研究了成虫第三天时在不同 6-OHDA 作用下线虫体内的氧化应激水平变化情况。

在成虫第三天, 在完成对随机挑选的液滴内单个线虫的运动行为数据的采集之后, 按§3.2.6 中的方法将这些线虫固定于楔形通道阵列中, 并对受到不同浓度 6-OHDA 作用下的线虫体内的氧化应激水平进行荧光成像。图 3-24 是分别在不同浓度 6-OHDA 作用后, CL2166 单个线虫体内的氧化应激水平的荧光图像, 可以明显看出随 6-OHDA 作用浓度的增加, 线虫体内的绿色荧光强度明显升高, 说明神经毒素 6-OHDA 会诱导线虫体内出现氧化应激; 作用的 6-OHDA 浓度升高, 线虫体内出现的氧化应激水平也随之升高。

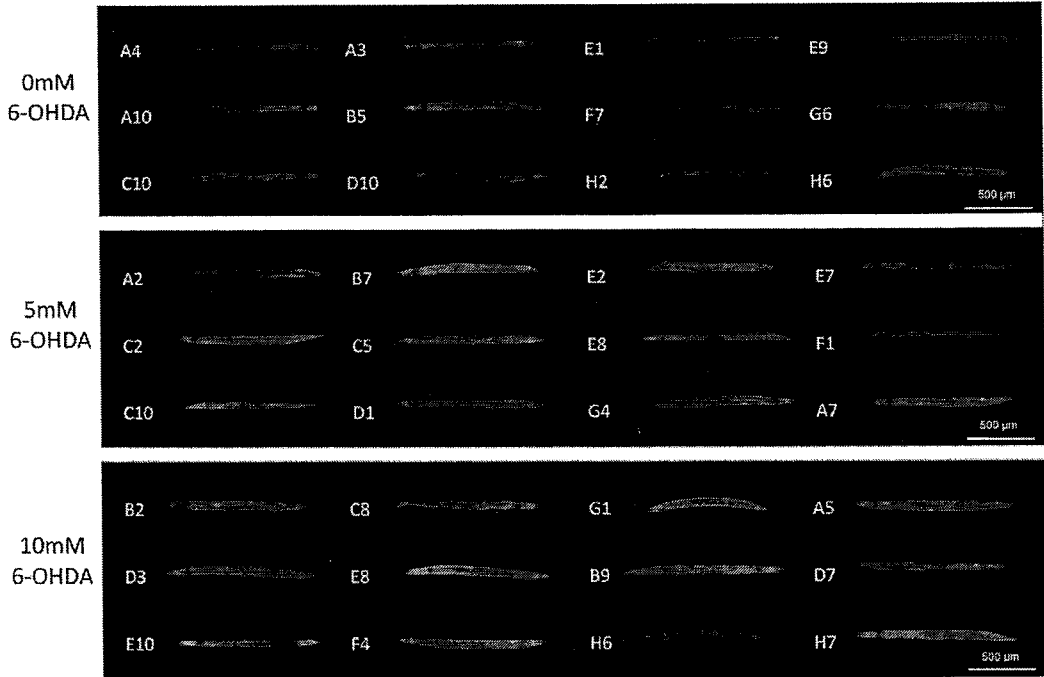


图 3-24 不同浓度 6-OHDA 诱导下, CL2166 线虫体内氧化应激水平的荧光图像。

Fig. 3-24 Fluorescence images of the oxidative stress level of CL2166 worms after 6-OHDA treatment of different concentrations.

对 CL2166 单个线虫在成虫第三天、不同 6-OHDA 浓度下的体内表达的绿色荧光强度进行平均统计, 所得的平均荧光强度与 6-OHDA 作用浓度关系图见图 3-25。如图所示, 在成虫第三天, 随着 6-OHDA 所用浓度的升高, CL2166 线虫体内表达的绿色荧光强度越来越强; 说明 6-OHDA 可以诱导线虫体内出现氧化应激, 氧化应激水平与 6-OHDA 呈剂量效应。

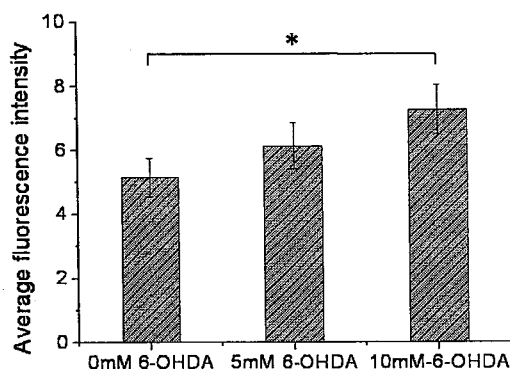


图 3-25 不同浓度 6-OHDA 诱导下, CL2166 线虫体内氧化应激水平的平均荧光强度。(\* $p < 0.05$ )

Fig. 3-25 Average fluorescence intensity of the oxidative stress level of CL2166 worms after 6-OHDA treatment of different concentrations, \* $p < 0.05$ .

#### 3.3.3.4 综合分析

我们将所采集到的单个线虫 (UA57 和 CL2166) 的荧光图像和对应的摆动频率曲线 (均为成虫第三天) 进行综合分析 (图 3-26)。由图 3-26a 可以看出, 在成虫第三天, 未经 6-OHDA 作用的对照组 UA57 线虫在多巴胺能神经元处呈现完整而明亮的绿色荧光, 同时保持较高的自由运动摆动频率; 而随着 6-OHDA 作用浓度的提高, UA57 线虫多巴胺能神经元的绿色荧光强度下降, 同时相应线虫的摆动频率也出现了下降; 说明 6-OHDA 会诱导线虫的多巴胺能神经元发生变性, 从而导致线虫产生运动缺陷 (摆动频率下降)。由图 3-26b 可以看出, 在成虫第三天, 未经 6-OHDA 作用的对照组 CL2166 线虫由体内氧化应激诱导的绿色荧光强度较低, 同时呈现较高的摆动频率; 而随着 6-OHDA 作用浓度的提高, CL2166 线虫由体内氧化应激诱导的绿色荧光强度上升, 而相应的线虫摆动频率随之下降; 说明在 6-OHDA 诱导下, 线虫

多巴胺能神经元发生变性的同时，其体内的氧化应激水平出现上升。上述结果显示：神经毒素 6-OHDA 诱导下，线虫会出现运动行为缺陷、多巴胺能神经元变性和氧化应激水平升高等多种响应；其中，多巴胺能神经元的变性直接导致了线虫运动缺陷的出现；而引起线虫体内氧化应激水平上升，可能是 6-OHDA 诱导线虫多巴胺能神经元发生变性的的重要途径之一。

对线虫的荧光强度和对应的摆动频率的平均统计柱图进行综合分析，见图 3-27。由图 3-27a 可以看出，在成虫第三天，随着 6-OHDA 作用浓度的提高，UA57 线虫多巴胺能神经元的平均绿色荧光强度下降，相同条件下的线虫摆动频率也出现了相同程度的下降；荧光强度与摆动频率的下降均与 6-OHDA 呈剂量效应。由图 3-27b 可以看出，在成虫第三天，随着 6-OHDA 作用浓度的提高，CL2166 线虫体内氧化应激诱导的平均绿色荧光强度上升，相同条件下的线虫摆动频率随之下降；在 10 mM 6-OHDA 作用下，线虫氧化应激水平及摆动频率与对照组有显著性差异。由上述结果得到的结论与上文相同，即：神经毒素 6-OHDA 诱导下的线虫会出现运动行为缺陷、多巴胺能神经元变性和氧化应激水平升高等多种响应，且对 6-OHDA 呈现剂量效应；6-OHDA 通过诱导线虫的多巴胺能神经元变性使其出现运动行为缺陷；而线虫体内氧化应激水平的上升，可能是 6-OHDA 诱导下多巴胺能神经元发生变性的主要原因之一。

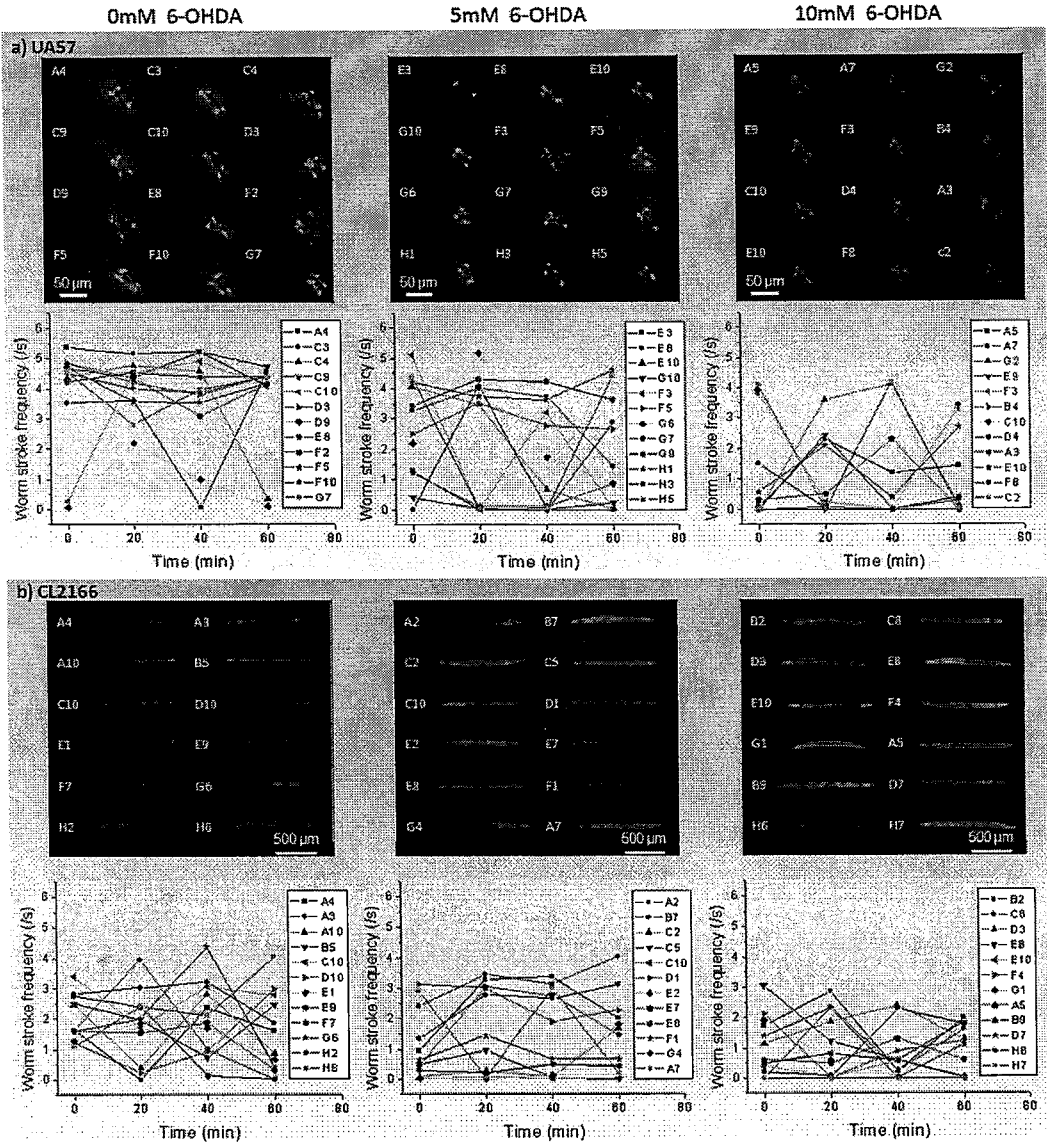


图 3-26 成虫第三天时，不同浓度 6-OHDA 作用下，单个线虫（UA57 和 CL2166）的荧光图像和对应的摆动频率曲线。(a) UA57 单个线虫的多巴胺能神经元荧光图像和对应的摆动频率曲线；(b) CL2166 线虫的体内氧化应激水平荧光图像和对应的摆动频率曲线。

Fig. 3-26 Representative fluorescence images and corresponding stroke frequency of individual UA57 and CL2166 worms in response to 6-OHDA at the

3rd day. (a) DAergic neurons fluorescence images and corresponding stroke frequency of individual UA57 worms after 6-OHDA treatment of different concentrations; (b) Oxidative stress fluorescence and corresponding stroke frequency of individual CL2166 worms after 6-OHDA treatment with different concentrations.

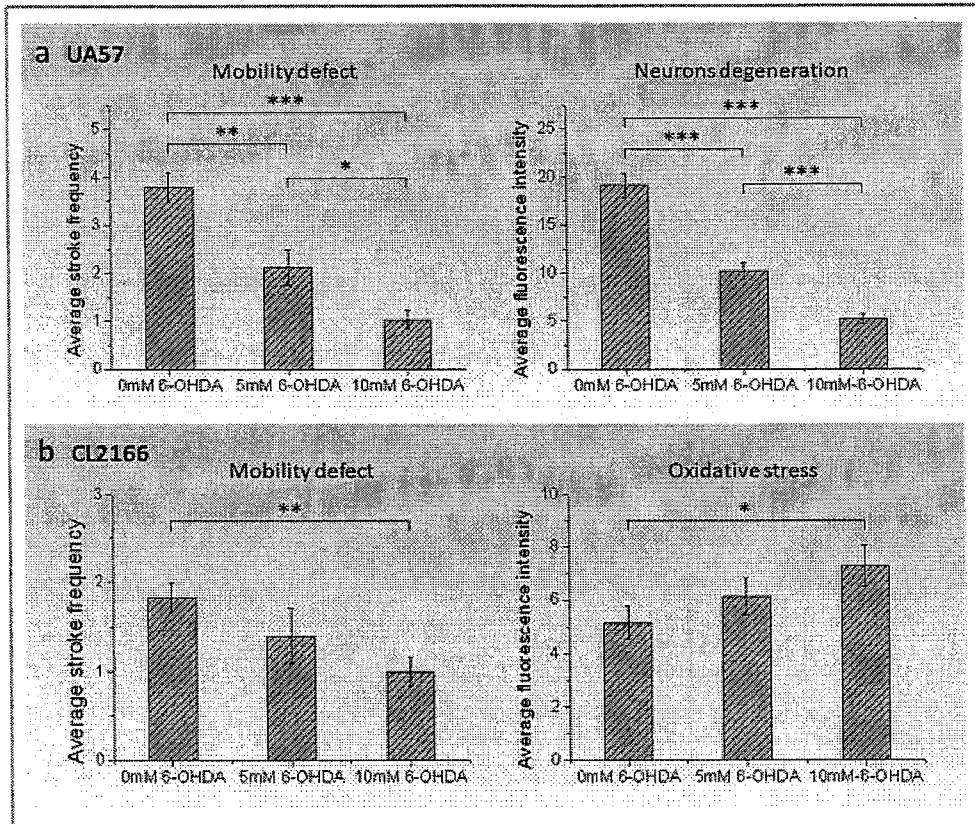


图 3-27 对第三天不同浓度 6-OHDA 诱导下, UA57 和 CL2166 线虫产生的运动缺陷、多巴胺能神经元以及氧化应激水平的定量评价。(a) 不同浓度 6-OHDA 诱导下, UA57 线虫的平均摆动频率和平均荧光强度; (b) 不同浓度 6-OHDA 诱导下, CL2166 线虫的平均摆动频率和平均荧光强度。(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .)

Fig. 6 Quantitative evaluation of the 6-OHDA induced representative

mobility defects, DAergic neurons degeneration and oxidative stress in strains UA57 and CL2166 at the 3rd day, respectively. (a) Average stroke frequency ( $\pm$  SEM) and quantitative fluorescence intensity ( $\pm$  SEM) of individual UA57 worms treated with different concentrations of 6-OHDA at the 3rd day. (b) Average stroke frequency ( $\pm$  SEM) and quantitative fluorescence intensity ( $\pm$  SEM) of individual CL2166 worms treated with different concentrations of 6-OHDA at the 3rd day, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001.

### 3.4 本章小结

本章设计研制了一种集成化双层液滴微流控芯片，并将其用于对神经毒素 6-OHDA 诱导下帕金森药理学模型线虫的运动行为缺陷、多巴胺能神经元变性以及氧化应激水平的研究中。该芯片集成了一个 T 形液滴生成器，一个液滴浮力捕获阵列和一个楔形通道阵列，可以自动、连续地完成液滴生成、单个线虫包裹、液滴固定、线虫行为监测、线虫固定以及线虫荧光成像等多个实验步骤。通过神经毒素 6-OHDA 诱导转基因株线虫（UA57 和 CL2166, young adult）建立帕金森病线虫模型体系，在芯片上考察了单个线虫的运动行为缺陷、以及相应的多巴胺能神经元变性情况及体内的氧化应激水平。结果显示神经毒素 6-OHDA 诱导下的线虫会出现运动行为缺陷、多巴胺能神经元变性和氧化应激水平升高等多种响应，且对 6-OHDA 呈现剂量效应；6-OHDA 可能通过提高线虫体内氧化应激水平导致其多巴胺能神经元发生变性，从而使线虫出现运动行为缺陷。

该工作的创新性包括：首次提出了一种全新的基于浮力原理的液滴捕获方式，为微流控芯片上的液滴捕获提供了一个设计更加简便、效果更加稳定的方法；首次实现了在液滴微流控芯片上对单个线虫的运动行为和荧光成像

的连续监测，且操作自动、便捷，通量高；首次在微流控芯片上实现了对线虫帕金森病模型的运动行为缺陷、多巴胺能神经元变性及氧化应激水平等指标的单个线虫水平同时检测，对于揭示帕金森病病因及筛选潜在药物具有重要的意义。

该液滴微流控平台具有制作简单、操作简便、重复性高、生物相容性好等优势，可能对现今单个线虫水平的帕金森病机制研究及高通量药物筛选起到促进作用。

### 参考文献

1. Esposito, E., Di Matteo, V., Di Giovanni, G., Death in the substantia nigra: a motor tragedy. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 2007, 7(6): 677-697.
2. Zhang, Y., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Oxidative Stress and Genetics in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Neurobiology of Disease*, 2000, 7(4): 240-250.
3. Jenner, P., Michael J. Aminoff, F. B. D. F. S. W. C. K., Eldad, M., Oxidative stress and Parkinson's disease, in *Handbook of Clinical Neurology*. 2007, Elsevier. p. 507-520.
4. Hallett, P. J., Brotchie, J. M., Striatal delta opioid receptor binding in experimental models of Parkinson's disease and dyskinesia. *Movement Disorders*, 2007, 22(1): 28-40.
5. Emborg, M. E., Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. *Journal of Neuroscience Methods*, 2004, 139(2): 121-143.
6. Reksidler, A. B., Lima, M. M. S., Zanata, S. M., Machado, H. B., da Cunha,

- C., Andreatini, R., Tufik, S., Vital, M. A. B. F., The COX-2 inhibitor parecoxib produces neuroprotective effects in MPTP-lesioned rats. *European Journal of Pharmacology*, 2007, 560(2-3): 163-175.
7. Schober, A., Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell and Tissue Research*, 2004, 318(1): 215-224.
  8. Chen, L., Feany, M. B., [alpha]-Synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a *Drosophila* model of Parkinson disease. *Nat Neurosci*, 2005, 8(5): 657-663.
  9. Masliah, E., Rockenstein, E., Adame, A., Alford, M., Crews, L., Hashimoto, M., Seubert, P., Lee, M., Goldstein, J., Chilcote, T., Games, D., Schenk, D., Effects of  $\alpha$ -Synuclein Immunization in a Mouse Model of Parkinson s Disease. *Neuron*, 2005, 46(6): 857-868.
  10. 陈生弟, 帕金森病动物模型的研制. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2003, 10(1).
  11. Nass, R., Miller, D. M., Blakely, R. D., *C-elegans*: a novel pharmacogenetic model to study Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 2001, 7(3): 185-191.
  12. Marvanova, M., Nichols, C. D., Identification of neuroprotective compounds of *Caenorhabditis elegans* dopaminergic neurons against 6-OHDA. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2007, 31(2): 127-137.
  13. Nass, R., Hamza, I., The Nematode *C. elegans* as an Animal Model to Explore Toxicology In Vivo: Solid and Axenic Growth Culture Conditions and Compound Exposure Parameters. *Current Protocols in Toxicology*. 2001: John Wiley & Sons, Inc.

14. Nass, R., Hall, D. H., Miller, D. M., Blakely, R. D., Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(5): 3264-3269.
15. McDonald, J. C., Duffy, D. C., Anderson, J. R., Chiu, D. T., Wu, H. K., Schueller, O. J. A., Whitesides, G. M., Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis*, 2000, 21(1): 27-40.
16. Nass, R., Hamza, I., The Nematode *C. elegans* as an Animal Model to Explore Toxicology In Vivo: Solid and Axenic Growth Culture Conditions and Compound Exposure Parameters, in *Current Protocols in Toxicology*, Costa, L. G., Hodgson, E., Lawrence, D. A., Reed, D. J., Editors. 2007.
17. Lowe, K. C., Davey, M. R., Power, J. B., Perfluorochemicals: their applications and benefits to cell culture. *Trends in Biotechnology*, 1998, 16(6): 272-277.
18. Holtze, C., Rowat, A. C., Agresti, J. J., Hutchison, J. B., Angile, F. E., Schmitz, C. H. J., Koster, S., Duan, H., Humphry, K. J., Scanga, R. A., Johnson, J. S., Pisignano, D., Weitz, D. A., Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions. *Lab on a Chip*, 2008, 8(10): 1632-1639.
19. Hulme, S. E., Shevkoplyas, S. S., Apfeld, J., Fontana, W., Whitesides, G. M., A microfabricated array of clamps for immobilizing and imaging *C-elegans*. *Lab on a Chip*, 2007, 7(11): 1515-1523.

## 总结论

本论文设计并制作两种集成化、功能化微流控芯片，并将其应用于线虫帕金森病药理学模型研究，得到如下结论：

1. 设计研制了一种集成化液滴微流控芯片，并将其用于神经毒素诱导下线虫运动缺陷行为的研究。该芯片集成了液滴生成、线虫包裹、液滴机械捕获等功能单元，实现了对神经毒素 MPP<sup>+</sup>诱导下单个线虫运动行为的检测。该工作首次将液滴引入微流控芯片线虫研究，显示了将高通量液滴用于单个线虫水平帕金森病药物筛选的可能性和优越性。

2. 在工作 1 的基础上构建了一种集成化双层液滴微流控芯片，增加了用于线虫固定的楔形通道阵列，并采用了一种全新的液滴浮力捕获方式，利用密度不同的水油两相所产生的浮力作用，将液滴捕获于芯片上层的捕获器中。该基于浮力的液滴捕获方法具有芯片设计简单，捕获过程简便，捕获效果稳定，易于与芯片上其他功能单元进行灵活组合和规模集成等优点，且捕获过程对液滴内的线虫不造成损伤。该芯片能连续完成液滴生成、线虫包裹、液滴浮力捕获、液滴释放和线虫固定等多个实验步骤，可以对通量化单个线虫的运动行为和荧光成像特征进行连续分析。

3. 利用工作 2 构建的液滴微流控芯片平台，考察了神经毒素 6-OHDA 诱导产生的线虫帕金森病药理学模型的运动缺陷、神经元变性及体内氧化应激水平等指标，首次在微流控芯片上实现了对线虫帕金森病模型的上述三个指标的单个线虫水平同时检测，显示了该平台用于单个线虫水平抗帕金森病药物筛选的潜力。

下一步的工作有可能从线虫长期培养及抗帕金森病药物筛选等方面的研究中找到突破。