

第一章 微流控芯片平台上的线虫神经生物学研究进展

1.1 引言

模式生物是指作为实验模型受到广泛研究,并对其生物现象有深入了解的物种;根据从这些物种所得的科学研究结果,可以总结出一些涵盖许多生物的模式,并广泛应用于生命科学的各个研究领域[1, 2]。作为模式生物需要满足以下特点:(1)生理特征能够代表生物界的某一大类群;(2)容易获得并易于在实验室内饲养繁殖;(3)容易进行实验操作,特别是遗传学分析。目前世界公认的用于生命科学研究的模式生物包括酵母、大肠杆菌、线虫、果蝇、斑马鱼和小鼠等,它们在揭示生命现象本质和探索人类疾病治疗方法的过程中发挥着举足轻重的作用[3-6]。

随着人类基因组计划的完成和后基因组研究时代的到来,利用模式生物构建人类疾病动物模型,由此进行疾病发病机理和新药筛选研究的这一策略得到了广泛的重视。原因在于:在了解人体基因结构功能和人类生理病理过程的研究中,无法直接用人体作为实验对象;而对生命活动有重要功能的基因在进化上是保守的,因此可以利用模式生物来阐明疾病发病机制,识别药物作用靶点以及筛选新型药物。迄今为止,以线虫、果蝇、斑马鱼和小鼠等模式生物为模型的人类疾病研究已涉及神经系统退行性疾病(如帕金森病、阿尔兹海默症、亨廷顿舞蹈症)、糖尿病、肿瘤、心血管疾病等多个领域,并取得了相当进展[7-13]。然而,其瓶颈在于相对落后的实验技术和相对低下的操作通量难以满足高通量筛选的要求,发展一种高通量、自动化的操控分析平台是目前亟待解决的重要问题。微流控芯片技术的出现,恰恰满足了这一需要。

微流控芯片又称芯片实验室 (Lab on a Chip), 指的是把生物和化学等领域中所涉及的样品制备、反应、分离、检测等基本操作单元集成或基本集成到一块几平方厘米(甚至更小)的芯片上, 由微通道形成网络, 以可控流体贯穿整个系统, 用以实现常规生物或化学实验室的各种功能的一种技术(图 1-1); 它的基本特征和最大优势是多种单元技术在微小平台上的灵活组合和规模集成[14, 15]。20 世纪 90 年代初, Manz 等人首次提出微全分析系统(Miniaturized Total Analysis System, μ -TAS) 的概念[16-18], 是微流控芯片研究的开始。随后, Manz、Harrison 和 Mathies 等人开展了一系列微流控芯片的开拓性工作, 主要包括对标准核酸片段和一些酶切片段的简单分离等[19, 20]。至 90 年代中后期, 随着 MEMS 技术的进步, 微流控芯片的制作技术得到长足发展, 已能加工出具有较高深宽比的复杂结构; 其应用范围也不仅仅局限于核酸分析, 而是开始向生命科学的各个领域渗透[21-24]。2004 年, 美国 Business 2.0 杂志在封面文章中将微流控芯片列为“改变世界的七种技术”之一; 2006 年, Nature 杂志为这种“21 世纪的技术”推出专辑[25-31]。

综上所述, 如果能够将微流控芯片技术引入以模式生物为模型的人类疾病研究中, 凭借微流控芯片所具有的多种单元操作灵活组合、整体可控和规模集成的特点, 可以为基于生物活体水平的人类疾病研究提供一个更为快速、高通量和自动化的技术平台, 推进人类疾病研究的发展。在众多的模式生物中, 秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*, 以下简称线虫) 由于独特的神经生物学优势和与微流控芯片尺寸相匹配的个体大小, 已成为在微流控芯片平台上进行模式生物研究的最主要对象, 相关的研究工作基本集中在线虫神经生物学领域, 并已取得了一系列重要的研究成果[32-39]。本章将对微流控芯片平台上的线虫神经生物学研究进展进行归纳和阐述。

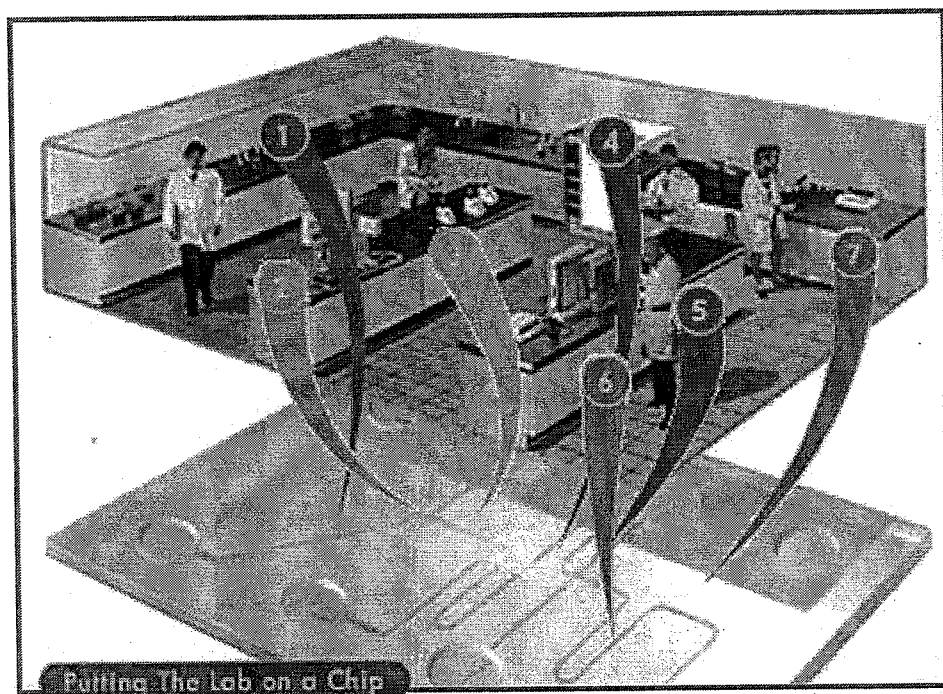


图 1-1“微流控芯片实验室”概念图。(其中不同颜色的数字代表不同的操作单元。)

Fig. 1-1 Illustration of the “Laboratory on a Microfluidic Chip”.(The numbers with different colors represent different operating units.)

1.2 模式生物秀丽隐杆线虫简介

1.2.1 线虫的基本特征

线虫(图 1-2)是一种微小的多细胞无脊椎动物,在自然情况下自由生活在土壤间水层中,以细菌为食。它身体透明,成虫体长约 1 毫米,宽约 50 微米,生命周期很短,20℃下仅为 3.5 天,寿命约为 12-18 天(图 1-3)。线虫绝大多数为雌雄同体(雄性个体仅占 0.05%),能够自我繁殖,一只成虫约可产下 300 个卵,繁殖十分迅速。线虫在实验室中极易培养,在 15℃~25℃

条件下，利用 NGM (Nematode Growth Medium, 线虫生长培养基) 琼脂培养基和液体培养基均可实现线虫培养，且虫体在液氮中可保存长达 25 年[40]。

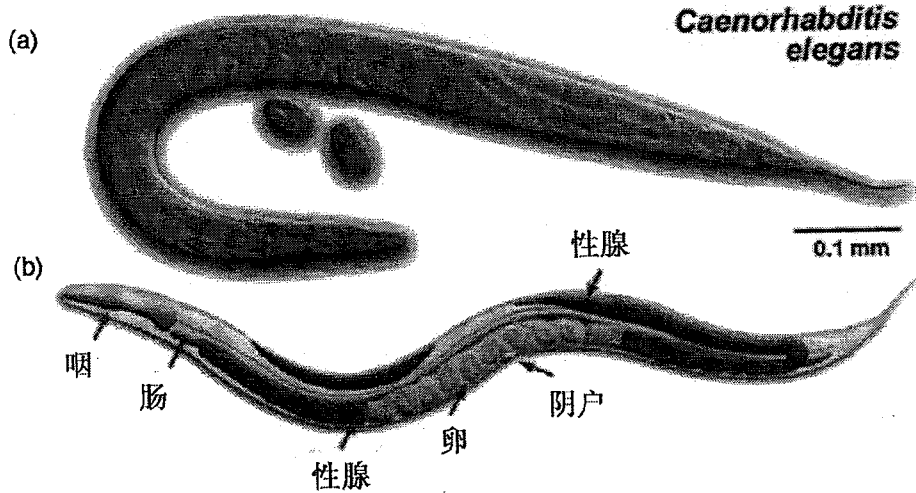


图 1-2 秀丽隐杆线虫的 (a) 微分干涉 (DIC) 显微镜照片及 (b) 结构示意图。

Fig. 1-2 (a) Photograph of *C. elegans* by differential interference contrast (DIC) microscopy; (b) Structural illustration of *C. elegans*.

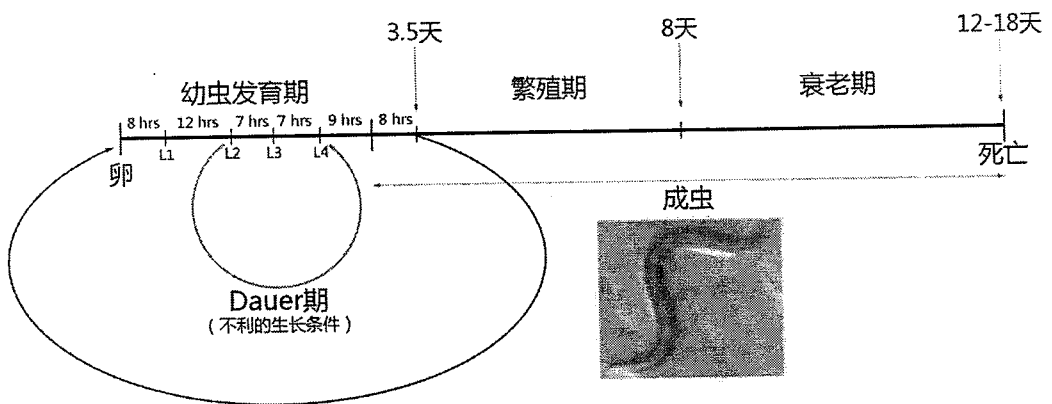


图 1-3 线虫的发育过程示意图。

Fig. 1-3 Development process of *C. elegans*.

基于上述特征，可以归纳出线虫在实验上的优势：（1）构造简单，各发育阶段皆可用体视显微镜来区别；（2）繁殖速度快，生命周期约 3 天，可在短时间内培养大量个体进行分析；（3）自由生活，以细菌为食，无寄生性，用简单的细菌培养基即可培养。（4）可以冷冻，保存相当方便；（5）雌雄同体，自体受精，提高了遗传试验和突变株品系维持的便利性；亦可用雄性进行异体受精和遗传分析；（6）从卵、胚胎、幼虫到成虫皆透明，利用相差显微镜可以清楚看见所有细胞，达到单一细胞的分辨率。

1.2.2 线虫研究的发展历程

线虫在当代生命科学的发展过程中起着举足轻重的作用。20 世纪 60 年代，分子遗传学的奠基人之一 Brenner 在确立了中心法则以后，感到分子生物学的主要问题已经解决，生物学的未来应着眼于发育生物学和神经生物学等复杂问题的研究，因此需要采用一种全新的模式生物进行研究。经过了一系列的尝试后，他最终选择了线虫为研究对象。经过约十年的研究，Brenner 于 1974 年发表了“*The Genetics of Caenorhabditis elegans*”这一里程碑式的文章[41]，详述了线虫的突变体筛选、基因定位等遗传操作方法，为以线虫为模型进行动物个体发育的遗传研究奠定了基础。与此同时，Brenner 实验室的另一位科学家 Sulston 使用微分干涉显微镜来研究线虫从受精卵到成体的所有细胞发育情况，并最终绘制出了当今世界上独一无二的细胞谱系图[42]。这张细胞谱系图揭示了雌雄同体线虫全部 1090 个细胞的发育过程，使科学家们能够在活体线虫的单个细胞水平上研究遗传发育的调控机制。在研究过程中，Sulston 发现线虫全部 1090 个细胞中的 131 个细胞以一种不变方式、在固定的发育时间和固定位置消失，这一现象就是现在为世人熟知的细胞凋亡。在后来近二十年中，Horvitz 的实验室利用遗传突变和基因克隆等手段，克隆

了十几个控制细胞凋亡的基因，发现了这些基因彼此合作参与细胞凋亡，更为重要的是他们在人身上也找到了同源基因，说明线虫与人在细胞凋亡的调控机制上是保守的[43, 44]（图 1-4）。Brenner, Sulston 和 Horvitz 三位生物学家也因在线虫的遗传发育和细胞凋亡方面的成就而获得了 2002 年诺贝尔生理及医学奖[45]。

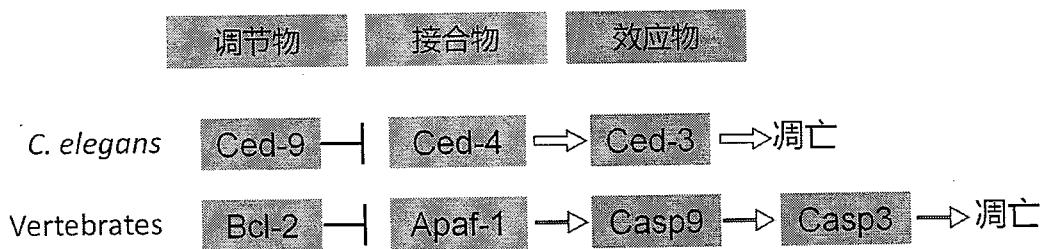


图 1-4 线虫与脊椎动物的凋亡通路概述图。

Fig. 1-4 Overview of the apoptotic pathway in *C. elegans* and vertebrates.

在 1986 年，John White 等运用连续电镜切片技术，绘制出线虫的了 302 个神经元之间的突触连接和神经通路网络，对神经系统的解剖结构进行了完整的描述[46]；结合 Sulston 绘制的细胞谱系，可以明确每一个神经元的解剖位置、结构、网络连接和神经递质。该工作对线虫的神经系统进行了完整的描述，对探讨线虫各种行为及其形成机制奠定了基础。

RNA 干扰 (RNAi) 及其遗传机制的发现是线虫对当代生命科学发展的又一重要贡献。RNAi 现象的发现始于三十多年前，当时人们发现反义 RNA 可以抑制内源性 mRNA，认为这是由于反义 RNA 与 mRNA 互补形成双链 RNA 干扰了 mRNA 的表达。1995 年，Guo 和 Kemphues 在利用反义 RNA 来抑制线虫 *par-1* 基因的表达时，注意到作为对照的正义 RNA 也可以抑制基因的表达[47]，认为这可能是由于当中有部分的反义 RNA 污染所致，错过了

生命科学史上的一个重大发现。1998年, Fire 和 Mello 等在线虫中进行反义 RNA 抑制实验时发现, 作为对照加入的双链 RNA 比单链正义或反义 RNA 显示出了更强的抑制效果, 且强于理论上 1:1 配对时的抑制效果, 因此推测在双链 RNA 诱导的抑制过程中存在某种扩增效应, 并且将这种现象命名为 RNAi[48]; Fire 和 Mello 因此获得了 2006 年诺贝尔生理及医学奖。研究至今, 对线虫的 RNAi 操作已非常简单, 只需给虫子饲喂转化了 RNAi 载体的大肠杆菌即可。

1998 年, 线虫全基因组测序的完成, 线虫成为第一个完成全基因组测序的动物。测序结果显示, 它的全基因组编码约 20000 个基因, 其中至少 40% 的基因在人基因组中有明显的同源物存在[49]。在基因测序的基础上, 结合 RNAi 等反向遗传学手段, 几乎可以对线虫的所有基因进行缺失功能分析和全基因组范围内的基因功能筛选。

1994 年, 哥伦比亚大学的 Chalfie 把绿色荧光蛋白 (GFP) 基因接在线虫的 6 个触感受器神经元的启动子后面, 并利用 GFP 的荧光对生物体和细胞进行标记和观察[50] (图 1-5)。这个研究成果发表于 *Science* 上, 而 Chalfie 本人也由于对绿色荧光蛋白研究的贡献获得了 2008 年度的诺贝尔化学奖。绿色荧光蛋白的应用, 在微观与宏观间架起了一座桥梁, 让科学家通过观察发光效应推测出在活的细胞、甚至生物体内的微观生命活动; 而这种将绿色荧光蛋白在拥有透明身体的线虫体内表达的策略, 极大地促进了对线虫活体内各种生物学现象和过程的研究, 如研究神经细胞的发育过程、追踪靶基因产物的动向等。

经过近四十年的不懈努力, 线虫的各种基本生物学特性都已经被研究得十分丰富而扎实: 线虫的细胞数目恒定 (雌雄同体为 959 个细胞), 且能够揭示所有细胞身世和命运的细胞谱系图已经绘制完毕; 线虫的基因测序已全部

完成，可提供线虫的全部遗传信息，总共约 20000 个基因中有 40% 与人类具有同源性；线虫的神经系统十分简单，仅含 302 个神经元，但神经递质和离子通道等基本组成与哺乳动物高度相似。时至今日，线虫这一生物学模型已在神经生物学、遗传与发育学、衰老与寿命、人类遗传性疾病、药物筛选、环境生物学和信号传导等领域得到了广泛的应用；总体来说，由于尚未全部了解其神经元功能和调控机制，以对线虫神经生物学的研究居多。下面我们对线虫模型在神经生物学方面的研究加以简单介绍。

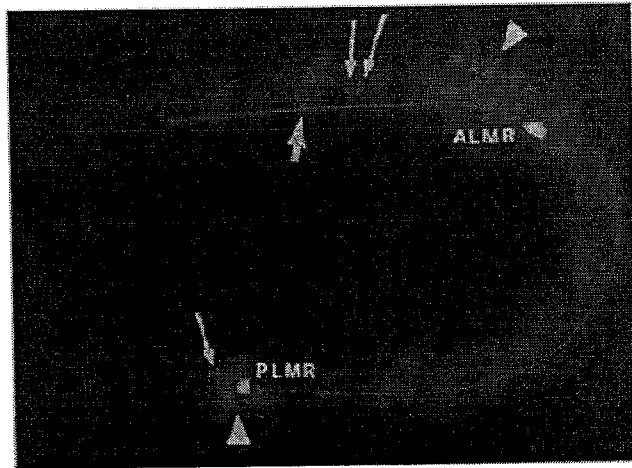


图 1-5 线虫 L1 期线虫体内表达的绿色荧光蛋白。

Fig. 1-5 Expression of GFP in a first-stage *C. elegans* larva.

1.2.3 线虫神经生物学的研究现状

传统的线虫神经生物学研究主要集中在两方面：一是对神经系统的研究，由此鉴定相应的基因或分子在神经元发育和功能中的作用；二是对行为的研究，由此研究行为相关的基因功能和神经机制。此外，近几年科学家们以线虫为模型，通过毒素诱导或转基因等技术构建了一系列人类神经系统疾病模型（如帕金森病），并开展了大量的针对疾病机制与潜在治疗药物的研究工作

[4, 8, 9, 11]; 这已成为线虫的神经生物学研究的另一个热门方向。

1.2.3.1 线虫的神经系统研究

线虫的神经系统虽然简单, 却很完善, 其神经递质、突触蛋白、离子通道等基本组成与人类具有高度的保守性; 线虫整个神经系统的解剖学结构已经通过连续电镜切片技术得到了完整的描述, 再结合 Sulston 绘制的细胞谱系, 可以明确每一个神经元的解剖位置、结构、网络连接和神经递质; 此外线虫身体透明, 以神经元荧光成像为主要手段的神经元特征分析十分方便; 这些都使得线虫成为研究神经系统的最佳模型。如美国西北大学的 Garcia 等人发现, 线虫体内神经递质 GABA 的缺失和乙酰胆碱的增强都会造成突触后肌细胞中蛋白的应激、折叠错误或去功能化, 这一现象说明, 过度兴奋并释放错误神经信号的神经元会引起靶肌肉细胞中蛋白自稳的失衡, 从而使肌细胞失去功能[51]。

1.2.3.2 线虫的行为研究

线虫的 302 个神经元根据功能可划分为感觉神经元、中间神经元和运动神经元三种类型, 能感受各种刺激如接触、温度、化学物质、离子等, 并通过肌肉协调运动作出趋性、进食、排卵、交配等行为, 这些行为方式反映了相互作用的神经元构成的神经网络的协同效应[52]。通过研究这些行为特征, 可以筛选行为异常的突变体, 研究相应的基因功能和神经机制。目前研究得比较多的线虫行为包括嗅觉、趋热性、趋化性和学习等。例如, 用激光微束消融 AWC 神经元会造成线虫对苯甲醛和异戊醇的反应受损, 而对其他气味感受无影响; 这一现象与 *odr-1*、*odr-2* 等基因突变的结果相同, 提示这些基因与 AWC 神经元的功能有关。Mori 等通过研究激光消融特定神经元后的线虫趋热行为, 发现感觉神经元 AFD 是线虫重要的趋热功能神经元[53]。Wicks

等人报道线虫的习惯化学习行为与感觉神经元和 4 对中间神经元之间的化学突触可塑性相关[54]。美国华盛顿大学的 Evason 等人研究发现, 抗癫痫药乙琥胺和三甲双酮分别可以延长 17%和 47%的线虫平均寿命, 即使对于抗衰老基因(如 DAF-16)缺失的线虫, 抗癫痫药仍然可以有效延长其寿命[55]。通过进一步的研究发现, 抗癫痫药能调控线虫与运动有关的神经功能活性, 提示神经系统活性会影响线虫衰老的速度。

1.2.3.3 以线虫为模型的帕金森病研究

由于神经系统的神经递质和离子通道等基本组成与人类高度保守, 线虫已成为探寻人类神经退行性疾病发生机理、构建相应新药筛选模型的良好模式生物。在一些已经建立的人类神经退行性疾病线虫模型中, 线虫表现出了与疾病症状类似的神经系统损伤和运动行为响应[11, 56-60], 因此可以通过考察药物或毒素作用下线虫的神经元和行为变化来进行基于生物活体水平的帕金森病机制研究和相关药物筛选。

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的神经退行性疾病, 主要病理特征是黑质纹状体多巴胺能神经元缺失和细胞内路易小体(Lewy body)的出现, 症状表现为为静止性震颤、肌强直、运动迟缓和姿势步态障碍等。迄今为止, 帕金森病的确切病因及发病机制尚不明确, 虽使用左旋多巴类药物可以缓解症状, 但使用 2—5 年后往往出现疗效减退以及远期的副作用(如剂末现象、开关现象等)。

利用神经毒素的诱导, 在线虫中已经成功建立了以多巴胺能神经元损伤为特征的帕金森病模型。例如将线虫暴露于 6-羟基多巴胺(6-OHDA)或甲基苯基四氢吡啶(MPTP)可导致其出现运动活性减弱、多巴胺能神经元变性等表型。Nass 等人利用 6-OHDA 选择性诱导线虫的多巴胺能神经元出现变

性[57] (图 1-6a), 并证实通过加入可干扰 DAT 基因功能的因素可对线虫起到保护作用。Braungart 等人通过将线虫暴露在 MPP+ 下构建了线虫帕金森病模型, 除了多巴胺能神经元的变性, 他们还观察到了线虫表现出的发育迟缓及一系列类帕金森病症状的运动缺陷[60] (图 1-6b)。

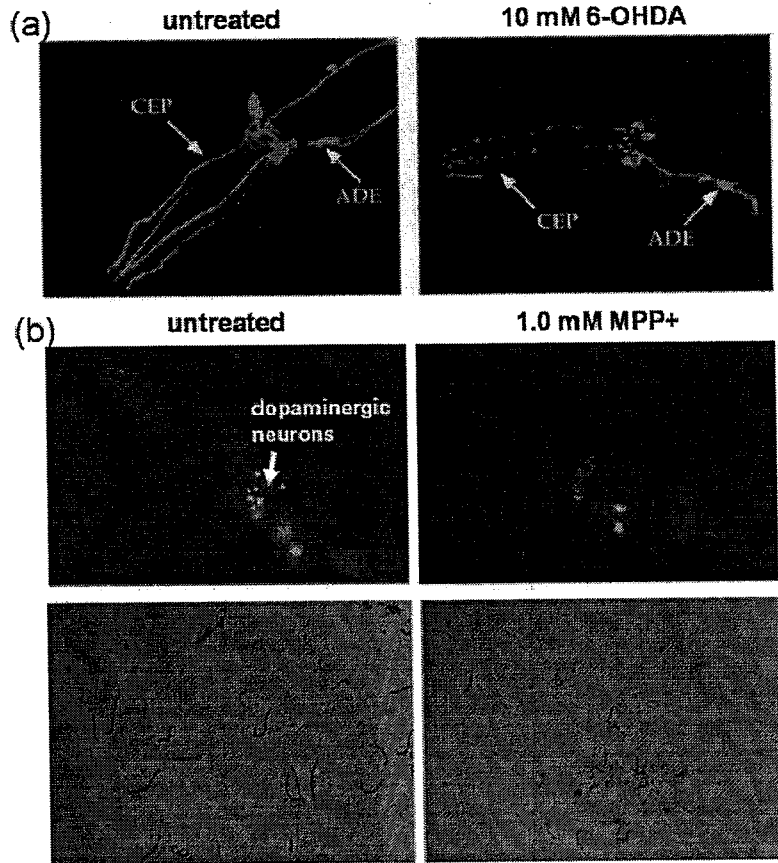


图 1-6 神经毒素对线虫的多巴胺能神经元和运动行为的影响。(a) 6-OHDA 对线虫多巴胺能神经元的影响; (b) MPP+ 诱导线虫出现多巴胺能神经元变性和显型变化。

Fig. 1-6 Impact of neurotoxins on *C. elegans*. (a) Impact of 6-OHDA on dopaminergic neurons of *C. elegans*. (b) MPP+ induced degeneration of dopaminergic neurons and phenotype in *C. elegans*.

1.2.4 线虫神经生物学研究方法的存在问题与发展方向

目前,以线虫为模型的神经生物学研究通常在琼脂板或多孔板中进行。在研究线虫行为时,首先需对线虫进行琼脂上或液体内的培养,再经过刺激施加、清洗、分选和检测等多个步骤,才能对线虫的行为响应进行分析[61-63];若要分析线虫的荧光成像特征,操作者必须用铂金铲将单个线虫手工挑取出来,再用胶水或麻醉剂固定线虫,才能满足荧光成像的要求。显而易见,上述操作过程手动、费时、繁琐,通量低,且难以在单个线虫水平实施精确的线虫操控和刺激施加。

因此,引进或开发一种新的线虫研究平台,能够克服常规操作中的缺陷,实现自动化、高通量的单个线虫分析,将会是未来线虫神经生物学研究的主要发展方向。新近发展起来的微流控芯片平台有可能成为满足上述要求的理想选择。

1.3 微流控芯片平台用于线虫神经生物学研究

1.3.1 微流控芯片简介

1.3.1.1 微流控芯片的基本概念和特征

微流控芯片又称芯片实验室(Lab on a Chip),指的是把生物和化学等领域中所涉及的样品制备、反应、分离、检测等基本操作单元集成或基本集成到一块几平方厘米(甚至更小)的芯片上,由毫米-微米级微通道形成网络,以可控流体贯穿整个系统,用以实现常规生物或化学实验室的各种功能的一种技术。微流控芯片的基本特征是多种单元技术在整体可控的微小平台上灵活组合、规模集成。而微流控芯片平台上微米尺度下的流体则具有层流、传质传热迅速等特征。图 1-7 为几种微流控芯片的照片。

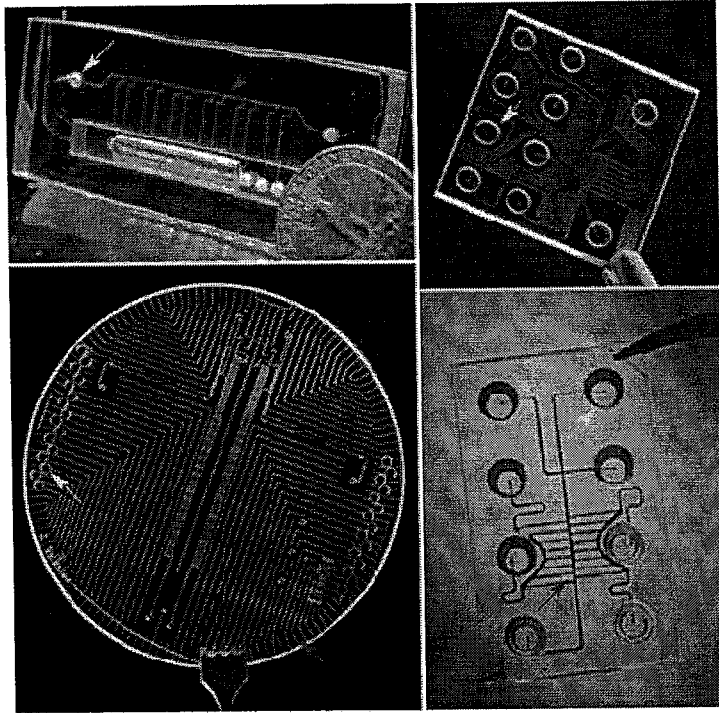


图 1-7 几种微流控芯片的照片。

Fig. 1-7 Photographs of different kinds of microfluidic chips.

1.3.1.2 微流控芯片的发展历程

自 20 世纪 90 年代初 Manz 等人首次提出微全分析系统(Miniaturized Total Analysis System, μ -TAS) 的概念以来, 微流控芯片的发展大体经历了三个阶段。第一阶段为上世纪整个 90 年代, 为微流控芯片的出现阶段, 这时人们对微流控芯片的认识还基本局限于分析化学领域, 主要工作集中在芯片上的毛细管电泳研究。第二阶段为本世纪的最初六、七年, 为微流控技术高速发展阶段: 2000 年, Whitesides 等人关于 PDMS 的软蚀刻方法在 *Electrophoresis* 上发表[64]; 2001 年, *Lab on a Chip* (芯片实验室) 杂志创刊, 并很快成为本领域的主流刊物; 2002 年, Quake 等以微泵微阀为特征的“Microfluidic

large-scale integration” 文章在 *Science* 上发表[65], 微流控芯片开始显露出其大规模集成的优势和特点并引起了学术界极大关注; 2004 年美国 *Business 2.0* 杂志在一篇封面文章中把芯片实验室列入了“改变未来的七种技术”之中。第三阶段自 2006 年至今, 微流控芯片技术开始广泛与各个应用领域相结合, 大量以微流控芯片为技术平台的有针对性的应用研究不断涌现; 作为“这一世纪的技术”, 芯片实验室所显示的潜在意义, 已逐渐被学术界和产业界所接受。

1.3.1.3 微流控芯片的制作方法

现有的微流控芯片加工技术以光刻技术为核心, 用于制作微流控芯片的材料主要有单晶硅片、石英、玻璃, 以及有机聚合物如聚甲基丙烯酸甲酯 (polymethylmethacrylate, PMMA)、聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS)、聚碳酸酯 (polycarbonate, PC)、水凝胶等。其中 PDMS 以其独特的弹性、良好的透光及透气性、优异的生物兼容性, 成为研究生物体 (如细胞、模式生物等) 的理想材料。

PDMS 芯片主要采用 Whitesides 课题组发展的原位聚合成型法进行制作 [64], 制作过程可分为模板制备、微通道成形以及芯片封接三个步骤 (见图 1-8), 具体描述如下。(一) 模板制备: 芯片模板一般由 SU-8 光刻胶在硅片上进行制备, 通过多层软刻蚀方法可获得与通道结构相反的三维立体结构。(二) 通道成形: 制成模板后, 将 PDMS 液态预聚物浇筑在模板上并固化、剥离, 可以快速重复地获得 PDMS 微通道层。(三) 芯片封接: 包括可逆封接与不可逆封接两种方式。将刚刚剥离模板的 PDMS 微通道层与玻璃基片 (或 PDMS 基片) 不经任何处理简单粘合在一起, 并得到密闭的 PDMS-玻璃杂交芯片 (或 PDMS-PDMS 芯片), 这种方式称为可逆封接; 采用可逆封接的 PDMS

微通道层可以重复使用，但芯片不能承受较大压力。将 PDMS 微通道层与玻璃基片（或 PDMS 基片）经等离子体处理后再粘合在一起，可以得到永久封接的 PDMS-玻璃杂交芯片（或 PDMS-PDMS 芯片），这种方式称为不可逆封接。此外，在制作 PDMS-PDMS 芯片时，也可对采用不同单体和引发剂配比的 PDMS 基片进行不可逆封接。

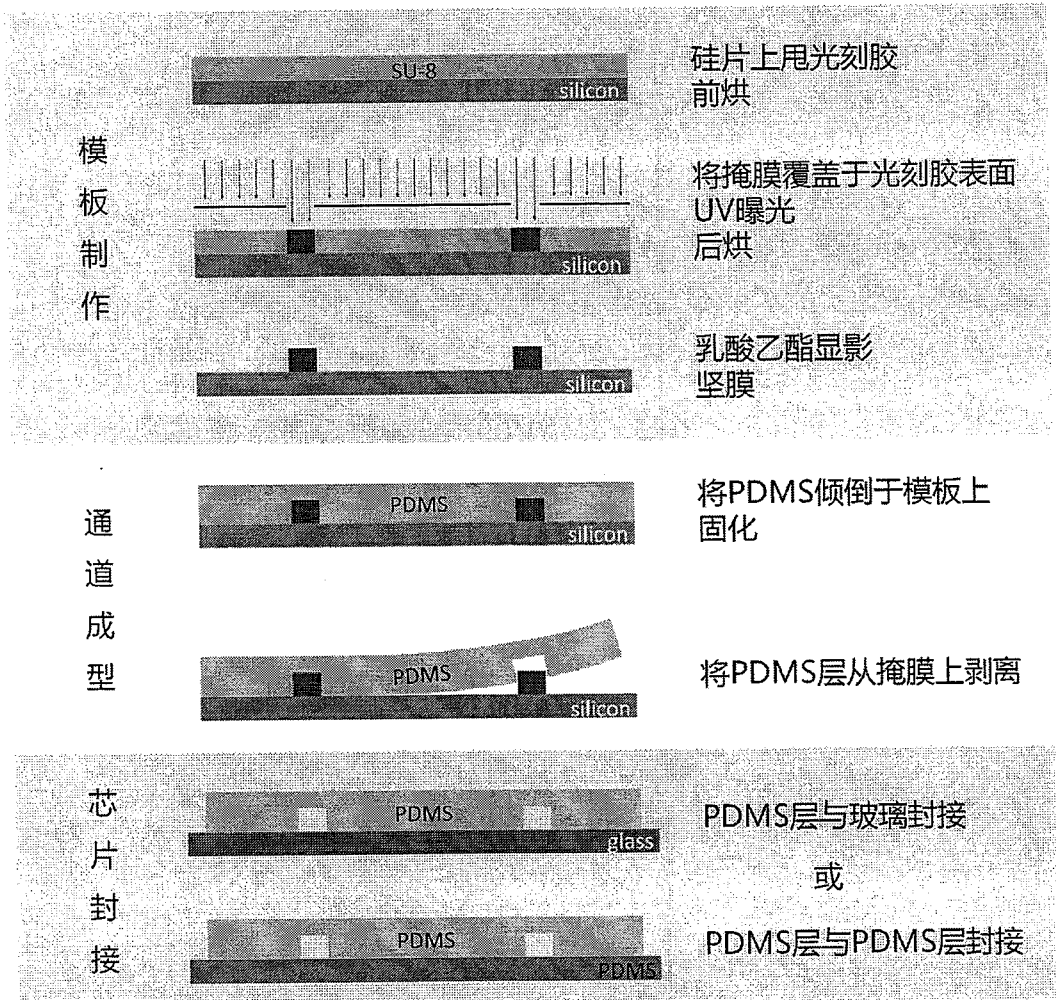


图 1-8 PDMS 微流控芯片制作流程图。

Fig. 1-8 Schematic of fabrication process of PDMS microfluidic chip.

1.3.1.4 微流控芯片的主要形式

按芯片内液体的流动形式，可以将微流控芯片分为通道微流控芯片和液滴微流控芯片两类。

1.3.1.4.1 通道微流控芯片

在通道微流控芯片中，通道内同相或多相互溶流体的流动呈连续流动形式。其主要特征为：流体以层流方式流动；各流层之间的质量传递主要依靠扩散；比表面积大，体系内的传热迅速。其中，层流特征为通道微流控芯片的最基本特征，提供了在微小空间内控制样品浓度、范围、温度等指标的可能性。Ismagilov 等人（图 1-9）运用通道微流控芯片上的层流研究了不同温度果蝇胚胎发育的影响[66]。

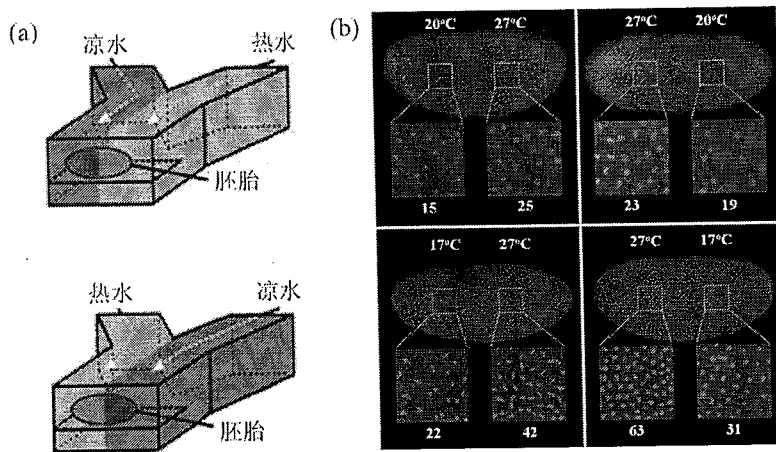


图 1-9 层流中具有不同温度的两相流体对果蝇胚胎发育的影响。(a) 基于层流的实验模型示意图；(b) 温度对果蝇胚胎发育速度的影响，蓝色方块区域内的白点表示胚胎中的核子，核子数目可表征胚胎发育的速度。

Fig. 1-9 Embryos development affected by temperature step of 20°C/27°C. (a) Illustration of the laminar flow-based experiment; (b) Quantitative determination of nuclei number in different regions of embryos effected by temperature step.

1.3.1.4.2 液滴微流控芯片

在液滴微流控芯片中，两种互不相容的液体在表面张力和流体剪切力的作用下，会在芯片通道内形成连续、高通量的单分散性液滴，体积通常为纳升至飞升级。与通道微流控芯片相比，液滴微流控芯片具有混合迅速、通量更高、试剂耗量更小等特点，已被广泛应用于化学反应[67]、蛋白结晶[68, 69]、材料合成[70, 71]、药物释放[72]等多领域研究中。Brouzes 等人（图 1-10）利用微流控液滴技术开展了单个细胞水平的高通量筛选研究[73]，该芯片包含液滴生成（A）、液滴融合（B）、液滴内含物混合（C）、细胞孵育（D）和荧光信号检测（E）五个功能单元，可以根据存活情况分选高通量单个细胞。

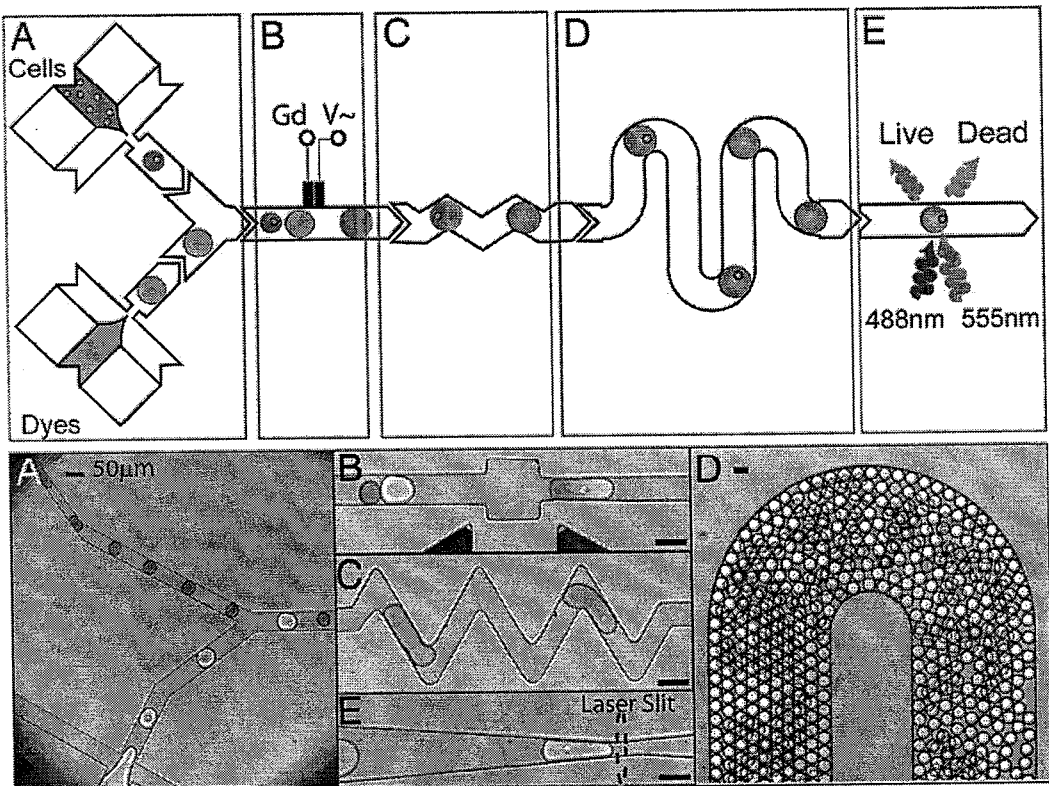


图 1-10 液滴微流控芯片上的高通量单细胞存活分析。

Fig. 1-10 A droplet-based microfluidic chip enabling high-throughput viability screening of single mammalian cells.

1.3.1.5 微流控芯片的应用领域

随着材料科学、微纳米加工技术和微电子学的进步，微流控芯片技术得到了迅猛发展，其应用范围也已涉及化学、生物学、医学、药学等各个方面，其研究对象从小分子、蛋白、DNA，到细胞、组织、器官乃至胚胎和生物个体无所不包，显示了强大的生命力和极其广阔的发展前景。

利用微流控芯片平台进行模式生物线虫研究是近年来刚刚兴起的热点，研究工作基本集中在对线虫神经生物学的范围内。针对这方面的工作，我们将在下面从技术和生物学应用这两个角度加以综述。

1.3.2 用于线虫神经生物学的微流控芯片技术

将微流控芯片平台用于线虫研究的独特优势在于：（一）常用的芯片材料PDMS 透气、透明、没有背景荧光，易于对线虫进行培养和观测；（二）微流控芯片的设计制作灵活，微通道尺寸与线虫大小匹配，易于为线虫构造具有不同几何特征的机械微环境；（三）微流控芯片操纵微小体积液体的能力非常适合于对单个线虫进行操控以及对外部刺激进行精确传递；（四）微流控芯片易于实现多种操作单元的大规模集成，由此可以对大量线虫群体进行并行或串行的高通量分析或药物筛选。

1.3.2.1 线虫固定

线虫固定是线虫荧光成像分析中的必需步骤。与常规的胶水或麻醉剂固定法[74-76]相比，微流控芯片技术为线虫荧光成像分析提供了一种更为灵活、便捷和温和的线虫机械固定方法，并避免了胶水或麻醉剂对线虫的副作用。目前，基于微流控芯片技术的线虫固定方法主要可分为“楔形通道法”和“微阀控制法”两种。

“楔形通道法”利用通道的几何学特征来固定线虫。楔形通道采用约30-50 μm 的固定深度，宽度从几百微米逐渐降至约十微米，利用液体流动把线虫推至并固定于楔形通道较窄的位置[77, 78]。Whitesides课题组利用楔形通道结构设计了一种能够快速、高通量固定单线虫的微流控阵列[78](图1-11)。该装置包括两部分：一个128条楔形通道的阵列，每个楔形通道最窄处仅为10 μm ，用于固定线虫；一个分配通道的分支网络，用于把线虫运输到楔形通道阵列中。利用静压力产生的液流自动地把单个线虫分配到每个通道中，15分钟内可以固定线虫可达百只以上，经固定后的线虫寿命及繁殖正常。

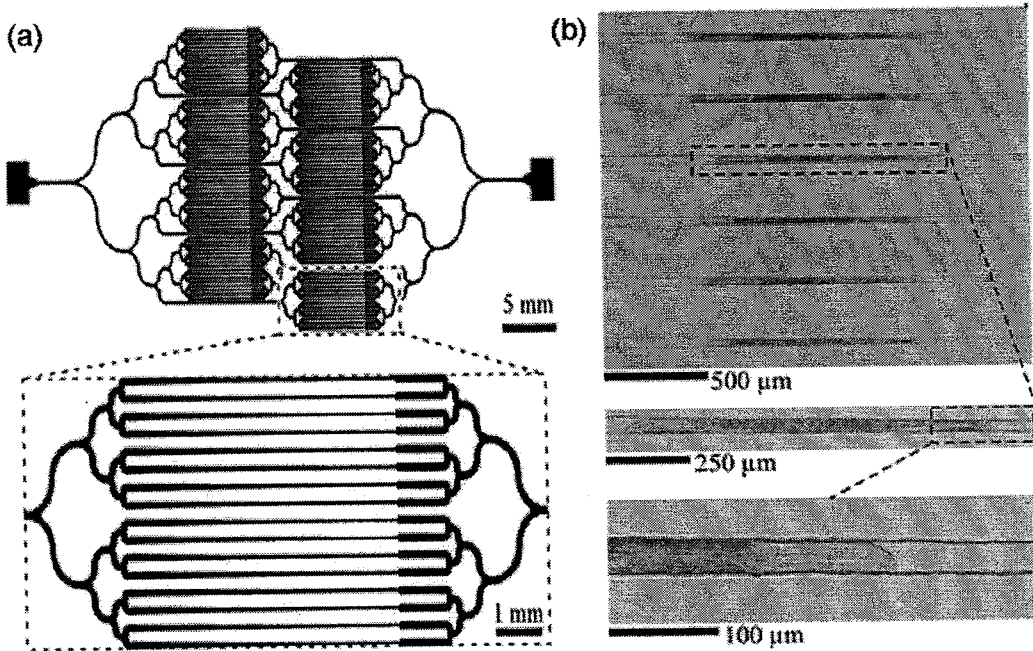


图 1-11 “楔形通道法”线虫固定阵列[78]。(a) 芯片示意图；(b) 固定在楔形通道中的线虫。

Fig. 1-11 Tapered channel array for *C.elegans* immobilization. (a) Schematic of the microfluidic array comprised 128 tapered channels; (b) Bright field images of the worms immobilized in the tapered channels.

“微阀控制法”主要通过控制微阀的开关来实现对单个线虫可逆、灵活的固定[79-82]。该类微阀与常规微流控微阀在结构上没有区别，只是前者的控制通道宽度应与线虫身体长度匹配。其工作原理为，由控制通道施加一定压力致使PDMS薄膜发生形变，向上或向下挤压流体通道，将液路层中的线虫挤压到通道一侧进行固定；撤销压力后，PDMS薄膜在自身弹力的作用下恢复原状，通道重新畅通，被固定的线虫得以释放[80]（图1-12a）。本课题组的马慧改进了上述设计，制造了一个基于微阀的线虫固定阵列，一次运行可以同时多个线虫进行固定或释放操作，极大地提高了实验的运行速度和通量[81]（图1-12b）。

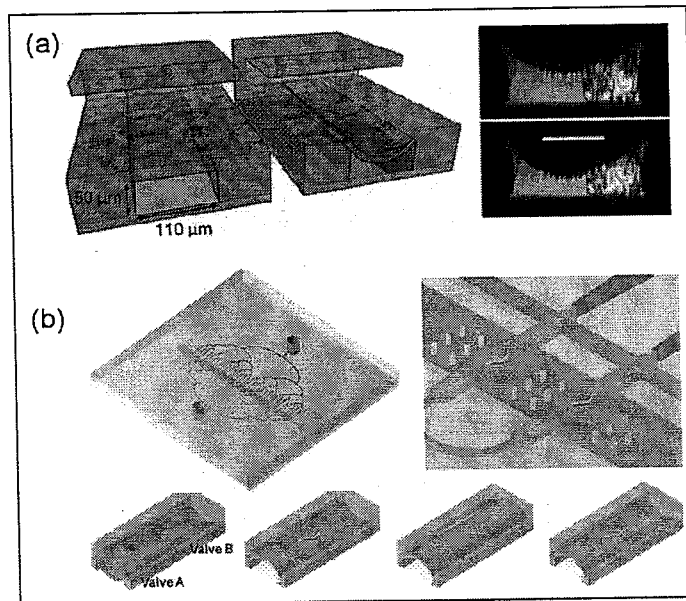


图 1-12 (a)“微阀控制法”的线虫固定示意图和捕获有线虫的通道截面双光子成像图[80]。(b) 基于微阀的线虫固定阵列设计图和线虫固定步骤示意图[81]。

Fig. 1-12 (a) Schematic of the microvalve-based worm immobilization and cross-sectional images of a trapped worm. (b) Design of the microvalve-based worm immobilization array and schematic of the immobilization process.

除了上述两种方法以外,还有其它一些利用真空侧吸[82, 83]、冷却[84]、高CO₂浓度[79]和温敏琼脂[85]来实现线虫固定的方法。例如,为实现更高分辨率的线虫神经元成像,Zeng等[82]在微阀基础上,于通道一侧增加了一排微细通道,先由微细通道抽吸将线虫半固定于通道侧壁,再由气路层施加压力使PDMS薄膜下压进一步封裹线虫,经过两步固定后,可以清晰地观测到被固定线虫的亚细胞级特征(图1-13a)。Chokshi等[79]利用PDMS薄膜的透气性,以CO₂取代通道中的氧气,可使线虫因受到麻痹而被固定(图1-13b)。

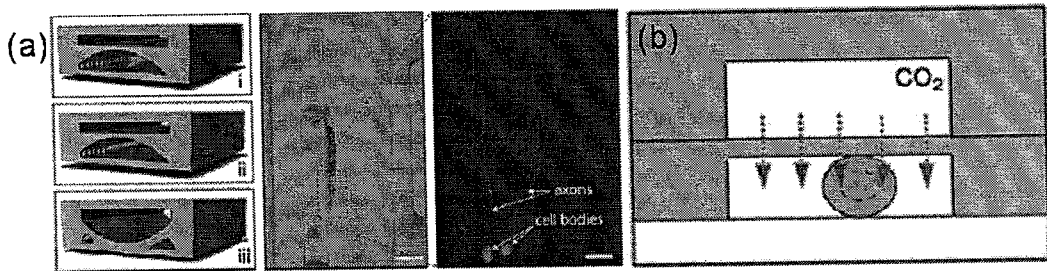


图 1-13 (a) 将微通道真空抽吸与微阀方式相结合进行线虫固定[82]。(b) 利用 CO₂ 麻痹线虫实现线虫固定[79]。

Fig. 1-13 (a) Immobilizing *C. elegans* by combining microvalve with suction channels. (b) Immobilizing *C. elegans* by anesthesia effect of CO₂.

1.3.2.2 线虫长期培养

长期培养的实现对于许多方面的线虫研究(如衰老研究)来说都至关重要。微流控芯片平台可以利用通道中的液流实现对线虫食物和排泄物的交换,PDMS材料的高透气性则可以为线虫提供充足的氧气供给,因此是一个进行线虫长期培养的潜在平台。Kim等[86](图1-14a)和Hulme等[87](图1-14b)分别利用微流控芯片实现了对线虫的长期培养。前者设计了一种基于离心力原理的CD形线虫培养微流控芯片,利用离心力作用自动驱动液体以实现

线虫的食物输送和废物排出过程，线虫群体可在芯片中存活超过 14 天。后者利用连续灌流的大肠杆菌悬液为培养在微流控腔室中的线虫提供食物并排除废物，并对线虫的体长和运动活性进行了长达 20 天的监测。

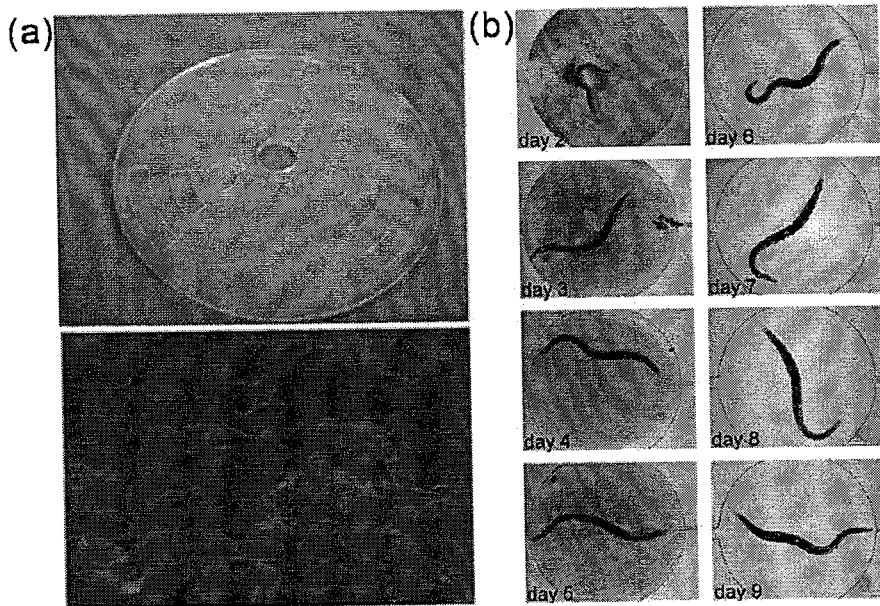


图 1-14 在微流控芯片平台上的线虫长期培养。(a) 利用离心力原理进行线虫长期培养[86]；(b) 利用灌流实现线虫长期培养[87]。

Fig. 1-14 *C. elegans* long-term culture on microfluidic chips. (a) *C. elegans* long-term culture using centrifugal force; (b) *C. elegans* long-term culture using liquid flow.

1.3.2.3 线虫所处微环境构建

借助于软光刻技术，可方便地加工出具有特定三维内部结构的微流控芯片，由此可以构建线虫的机械微环境，并对它们的运动形态或运动范围进行限制。Lockery 等人[88]和 Park 等人[89]分别设计并制作了被称为“人工土壤”

的微流控芯片。相比于平滑的琼脂板表面，这种经过特别设计的芯片微环境更接近于线虫自由生活的土壤环境，在其中线虫可能会表现出一些不同以往的特殊运动特征。前者以凸起的 PDMS 微柱模拟土壤中的颗粒（图 1-15a），分别对不同微柱尺寸和间距情况下线虫的运动状态及转向频率进行了考察。后者采用琼脂作为芯片材料，对制作好的琼脂层不进行封接而直接使用（图 1-15b）。研究人员发现，在这种开放的非均相液体微环境中，线虫的摆动频率和游动速度相比于琼脂板或液体培养基明显加快，机械感受对于线虫在此非均相环境中的运动具有重要作用。Qin 等人[90]在 PDMS-琼脂杂交芯片上构建了几个不同结构的芯片 U 形和 T 形迷宫，并分别对线虫的探索和学习行为进行了研究。

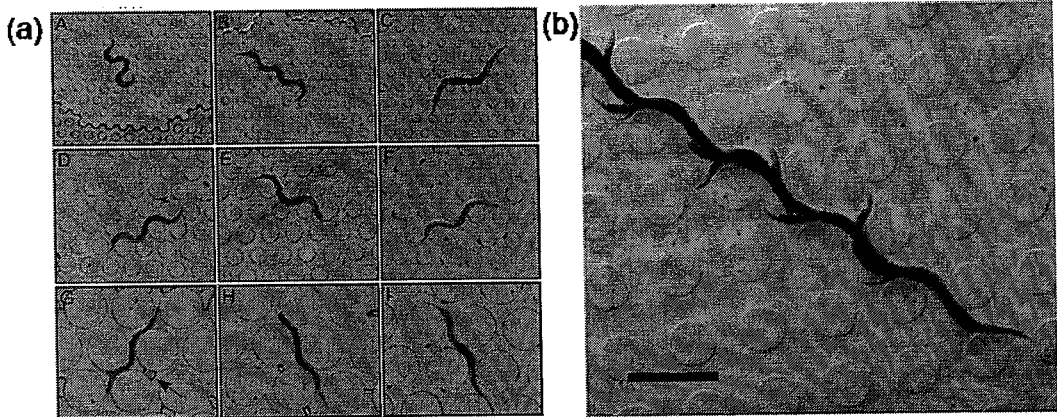


图 1-15 用于线虫运动行为研究的“人工土壤”微流控芯片[88, 89]。

Fig. 1-15 The “artificial soil” microfluidic chips for *C. elegans* mobility behavior assay.

1.3.2.4 对线虫的刺激施加

线虫能对各种微小刺激（如化学物质、温度等）作出响应。利用微流控芯片的层流及快速传质传热的特性，可以实现对线虫的刺激物施加过程的精

确控制（包括时间、种类、浓度等）。Gray 等[91]（图 1-16a）和 Zimmer 等[92]分别在 PDMS-琼脂杂交芯片上研究了线虫对不同 O_2 浓度的行为响应。Chronis 等人[93]（图 1-16b）和 Chalasani 等人[94]则在固定线虫后，分别对线虫施加了精确、可切换的嗅觉刺激，并研究了嗅觉受激情况下线虫的神经元特征。

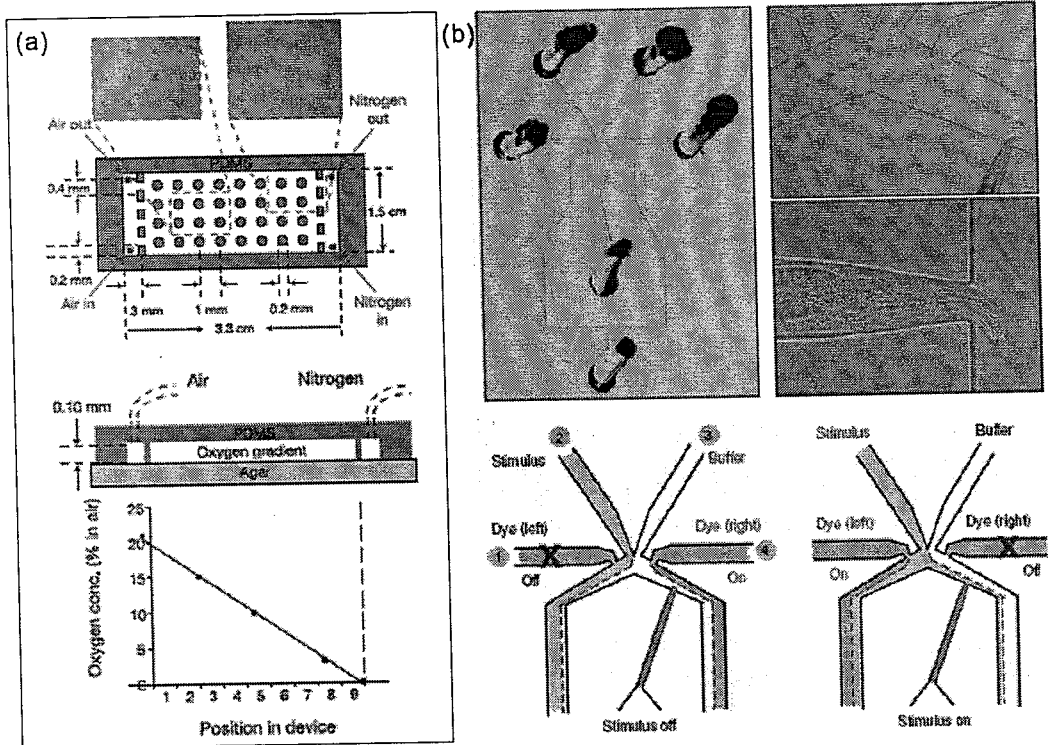


图 1-16 (a) 用于线虫趋氧性行为研究的微流控芯片[91]; (b) 用于线虫嗅觉受激下神经元活性研究的微流控芯片[92]。

Fig. 1-16 (a) A microfluidic device for *C. elegans* aerotaxis; (b) The “olfactory” chip for correlating odor stimulus with neuronal activity in *C. elegans*.

1.3.2.5 线虫分选

线虫是一种病理学和药理学研究的理想模式生物，实现针对其特性而进

行的高通量评价与分选对于药物筛选具有重要意义。Chung 等人[84, 95] (图 1-17) 制造了一个多阀集成的微流控装置, 用于自动识别线虫的表型特征并操控线虫位置, 并实现了基于线虫形态学和荧光强度特征的高通量分选。

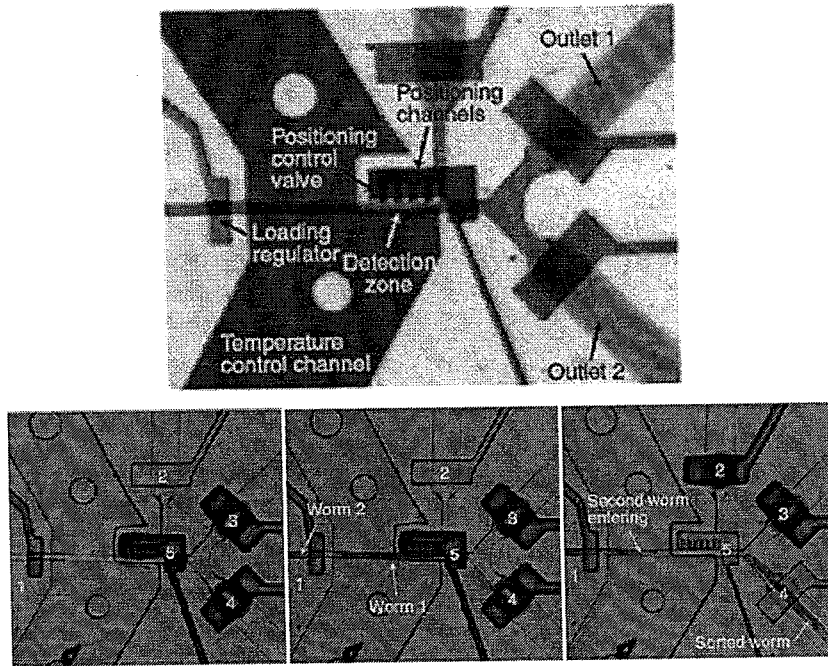


图 1-17 用于基于线虫形态学高通量筛选的多阀集成微流控芯片[84]。

Fig. 1-17 A microvalve-based integrated microfluidic chip for rapid and automatic phenotyping and sorting of *C. elegans*.

1.3.3 微流控芯片平台上的线虫神经生物学研究

1.3.3.1 微流控芯片平台用于线虫行为研究

线虫的行为反映了相互作用的神经元构成的神经网络的协同效应, 它取决于多种因素, 包括外部刺激、以往经历、神经元结构及内环境变化等。对线虫的行为研究不仅可以作为一种直观且有力的研究手段, 为基因功能筛选

及神经系统疾病治疗药物筛选奠定基础，而且可以为被测基因与神经功能之间的因果关系提供重要信息。

1.3.3.1.1 线虫的运动行为研究

研究线虫的运动行为方式对于描绘线虫的其他多种行为（包括趋化、趋热、学习等）具有重要意义。一般来说，在琼脂上，野生型线虫在平滑表面上爬行，同时沿身体形成正弦形波浪；在液体中，线虫通常呈 C 形姿态游动 [96]。在微流控平台上，线虫的各种运动行为和运动形态都可以得到充分的研究。

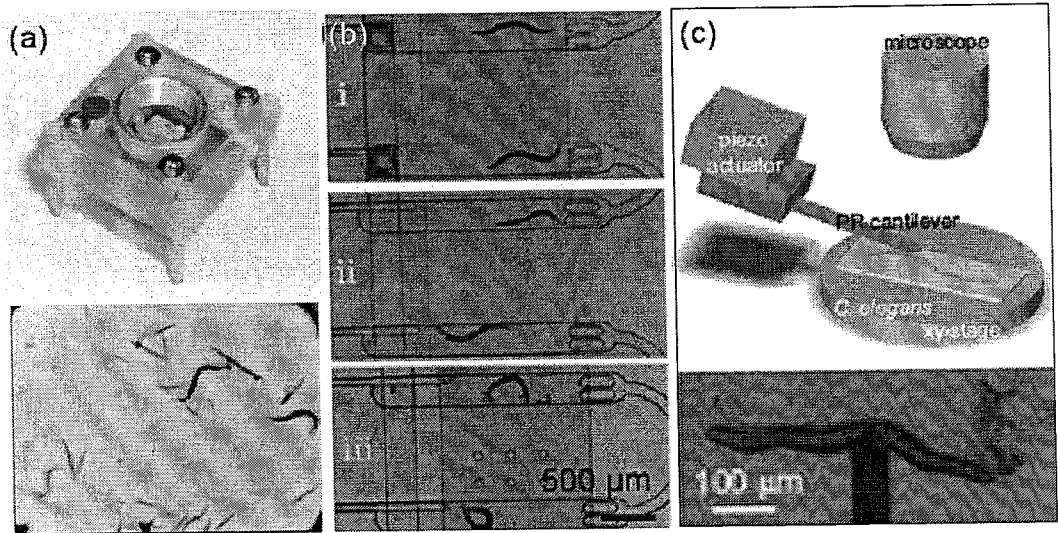


图 1-18 微流控芯片平台上的线虫运动行为研究。(a) 利用微流控阴影成像装置进行线虫运动行为研究[97]；(b) 利用微通道进行线虫运动行为研究[81]；(c) 利用微流控芯片上的微米级压阻悬臂测量线虫运动的机械特性[98]。

Fig. 1-18 *C. elegans* mobility behavior assay on microfluidic platform. (a) Using a microfluidic shadow imaging system to study the mobility behavior of *C. elegans*; (b) Using microfluidic channels to study the mobility behavior of *C. elegans*; (c) Analysis of nematode mechanics by PR-cantilever on microfluidics.

在 2005 年, Lange 等[97] (图 1-18a) 利用一个微流控阴影成像系统研究了航天飞行对线虫运动行为的影响, 测定了线虫运动活性与周围温度间的关系, 发现线虫的摆动频率随温度的上升而上升。本课题组的马慧等人[81] (图 1-18b) 利用微阀将单个线虫捕获在相对较大的微流控通道中, 并研究了线虫对神经毒素 MPP+的运动行为响应。结果显示对照组线虫表现出了较高运动活性, 且正弦形和 C 形姿态的出现频率很高; 而经 MPP+作用的线虫则出现了明显的运动缺陷, 如运动缓慢、僵直和卷曲形态。Park 等人[98] (图 1-18c) 通过在微流控芯片上构造微米级的压阻悬臂 (PR-cantilever) 作为力-位移传感器, 来测量线虫运动时的机械特性。

1.3.3.1.2 线虫的趋化与趋电性行为研究

线虫会对外部施加的化学梯度刺激和电场刺激产生行为响应, 分别被称为趋化性和趋电性[99, 100]。利用微流控芯片, 可以对所施加的化学梯度或电场刺激的范围和条件进行精确、灵活和可重复的控制, 而线虫由此所产生的趋化或趋电行为可以得到实时记录[88, 89, 97, 101-103]。

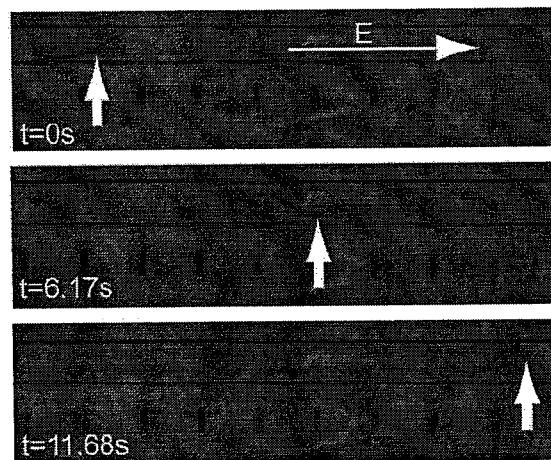


图 1-19 微流控芯片上的线虫趋电性研究[102]。

Fig. 1-19 *C. elegans* electrotaxis analysis on microfluidic chip.

Gray[91]等人设计并构建了一个 PDMS-琼脂杂交芯片，在检测腔室内产生和维持了稳定的氧气浓度梯度并研究了线虫对不同氧气浓度的行为响应。他们发现线虫对 5-12% 的氧气浓度表现出了强烈的行为偏好，而远离其他的氧气浓度水平。Rezai 等人[102, 103] (图 1-19) 对一个直通道施加交变电场，发现 1 Hz 以上的交变电场频率可以用来对通道内的线虫进行定位，这种方法将会用于进行微流控芯片平台上的线虫精确控制、定位和传输。

1.3.3.1.3 线虫的学习行为研究

线虫是研究行为可塑性的重要模式生物之一。目前，针对线虫学习行为的研究已经在多种微流控芯片平台上展开[98, 104]。Zhang 等人[105]利用一个 PDMS-琼脂杂交芯片研究了由致病菌诱导的线虫嗅觉厌恶学习行为，并深入分析了 ADF 化学感应神经元中的复合胺在这一学习过程所起的作用。本课题组的 Qin 等[90]利用 PDMS-琼脂杂交芯片制作了一个复杂 U 形迷宫芯片和一个 T 形连续迷宫，分别用以研究线虫的探索行为和联想学习行为，并且首次发现神经递质多巴胺与线虫的探索与学习行为有关 (图 1-20)。

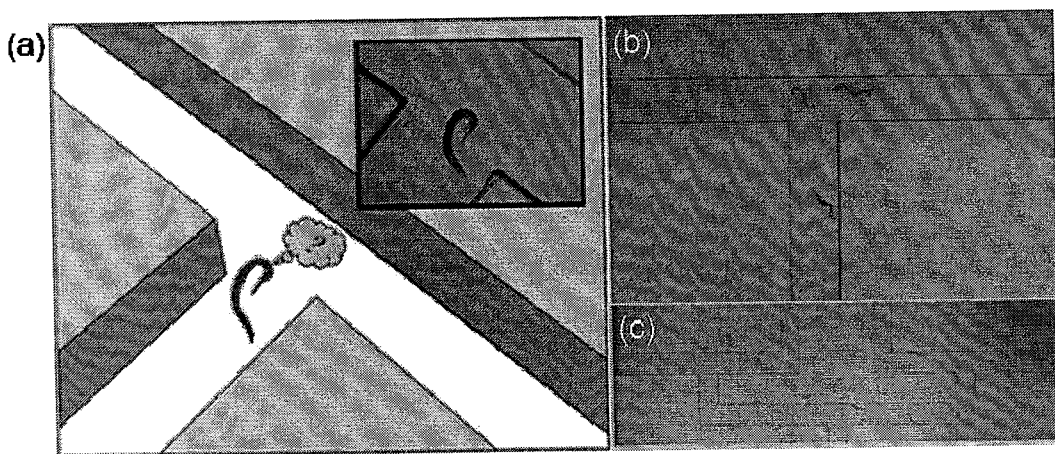


图 1-20 用于线虫探索和学习行为研究的微流控芯片迷宫[90]。(a) 实验示意图；(b) 为线虫在 T 形迷宫中的照片；(c) 为线虫在 U 形迷宫中的照片。

Fig. 1-20 Microfluidic maze for *C. elegans* exploration and learning behaviors assay. (a) Schematic of the experiment on microfluidic maze; (b) Photograph of *C. elegans* navigating a T-maze; (c) Photograph of *C. elegans* navigating a complex U-maze.

1.3.3.2 微流控芯片平台上的线虫神经系统研究

尽管线虫的神经系统很简单，只有 302 个神经元，但其神经递质、突触蛋白和离子通道与人类高度保守；此外，由于线虫身体透明，线虫的神经元特征可以通过神经荧光成像手段进行研究。凭借其独特的优势，微流控芯片平台目前已经被应用于对线虫神经系统的研究中，包括神经元活性和神经元消融及再生。

1.3.3.2.1 线虫的神经元功能研究

新近出现的钙离子荧光指示剂可以追踪线虫活体内的钙离子瞬时发光，从而监测神经元活性；结合同时进行的行为分析，可以获得单个神经元水平的线虫行为产生机制[106]。最近，用于进行线虫神经—行为分析的一系列微流控芯片已经出现[92-94, 107]，利用这些微流控芯片，不但可以同时得到线虫的行为和神经元成像信息，而且对线虫的刺激施加更加灵活、精确、可控，使钙离子荧光成像这一技术得到更为充分的应用。

Chronis 等[93]利用楔形通道实现了对单线虫的神经元活性成像。该楔形通道比线虫身体略宽，线虫在其中可以适当地自由活动，但所受到的限制又足以让研究人员监察其神经元特征。研究者利用图 1-21a 所示的“行为芯片”，研究了线虫虫体波动过程中的 AVA 神经元特征。Zimmer 等人[92]研制了一种可以对线虫实施固定并同时施加氧气刺激的双层 PDMS 微流控芯片，用于研

究线虫 URX 和 BAG 神经元活性对不同氧气浓度的响应，结果显示 URX 和 BAG 神经元的活性分别被氧气水平的升高和降低所激活（图 1-21b）。

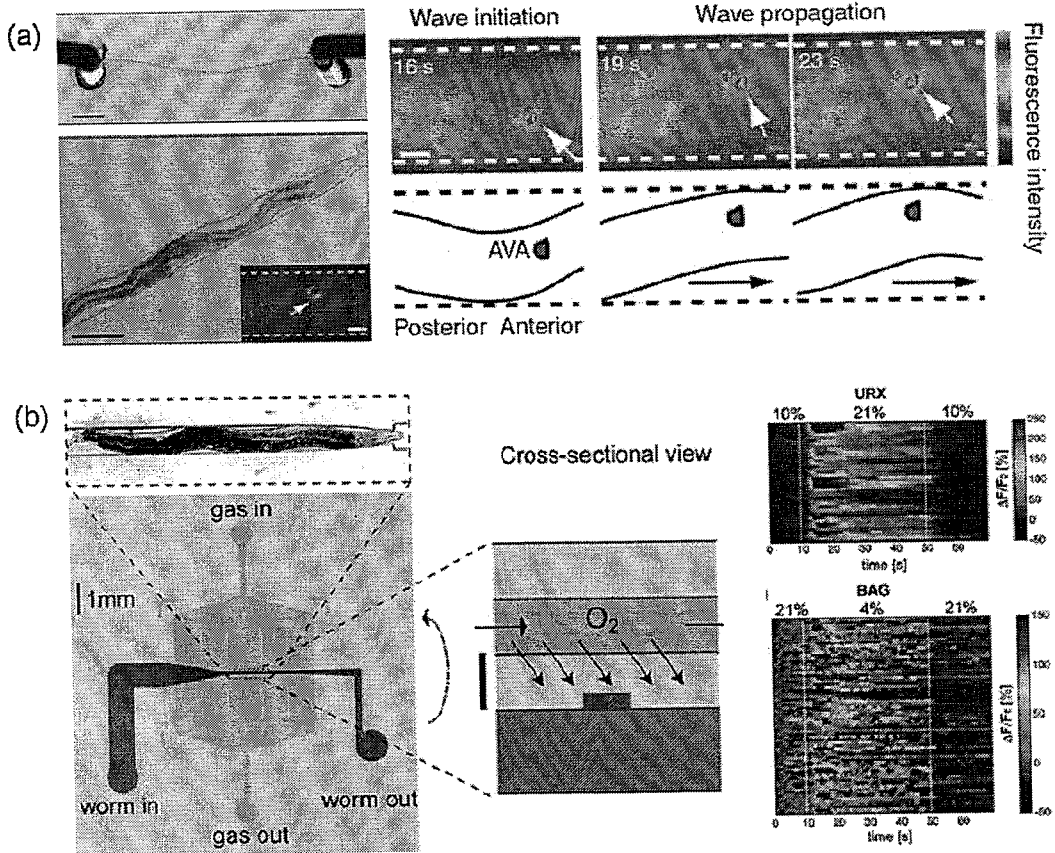


图 1-21 (a) 利用基于楔形通道设计的“行为芯片”研究线虫运动过程中的 AVA 神经元活性[93]。(b) 利用 PDMS 双层芯片研究线虫 URX 和 BAG 神经元活性对不同氧气浓度的响应[92]。

Fig. 1-21 (a) The study of the AVA neuron activity of *C. elegans* in moving process on a tapered-channel-based "behavior chip". (b) The study of the calcium transients in individual URX and BAG sensory neurons of *C. elegans* responded to O_2 upshift and downshift on a double-layer PDMS chip.

1.3.3.2.2 线虫的神经元变性研究

将线虫暴露于神经毒素（如 6-羟基多巴胺、甲基苯基四氢吡啶、鱼藤酮等）可导致其多巴胺能神经元变性，并出现类帕金森病症状的运动缺陷，得到线虫帕金森病药理学模型。将微流控芯片技术与线虫帕金森病模型研究相结合，将促进单个线虫水平的帕金森病研究，有望明确帕金森病的发病机制，并实现对潜在的预防或治疗药物的高通量筛选。

本课题组的马慧等人[81]（图 1-22）在一个基于程控微阀的微通道阵列上，对神经毒素甲基苯基碘化吡啶离子（MPP⁺）诱导的线虫运动行为缺陷及其产生机制进行了考察，首次实现了在单个线虫水平对其运动行为和多巴胺能神经元特征的同时、实时监测，结果显示 MPP⁺致线虫运动缺陷与其体内多巴胺能神经元的缺失密切相关。



图 1-22 神经毒素诱导下，单个线虫的多巴胺能神经元变性情况。MPP⁺作用时间 4 小时，作用浓度分别为：(i) 0 mM, (ii) 0.5 mM, (iii) 1.0 mM。

Fig. 1-22 Dopaminergic neuron degeneration of individual *C. elegans* by treating with MPP⁺ for 4h. The concentrations of treated MPP⁺ are as follows: (i) 0 mM, (ii) 0.5 mM, and (iii) 1.0 mM.

1.3.3.2.3 线虫的神经元消融与再生研究

在神经生物学中，了解特定神经元的功能及其再生机制是一个重要的问题，对发展人类神经系统疾病的新治疗方法起着至关重要的作用。利用新近

出现的飞秒激光手术技术，可以切断线虫的特定轴突，研究相应的神经元功能及术后神经再生情况[108]。微流控芯片技术恰可提供该手术过程中所需的对线虫的完全固定及其微环境的精确控制，因此已成为一种较为成熟的线虫神经元再生研究平台[77, 80, 82, 109]。

Guo 等人[80]和 Zeng 等人[82]分别在微流控平台上利用微阀提供手术需要的对线虫精确固定要求，利用飞秒激光手术切断轴突，并研究了后来的神经再生过程（图 1-23）。Chung 等人[109]利用低温加微阀限制线虫的运动，利用软件控制图像识别和自动的细胞消融，有望得到更加自动化和高通量的线虫神经元切除。

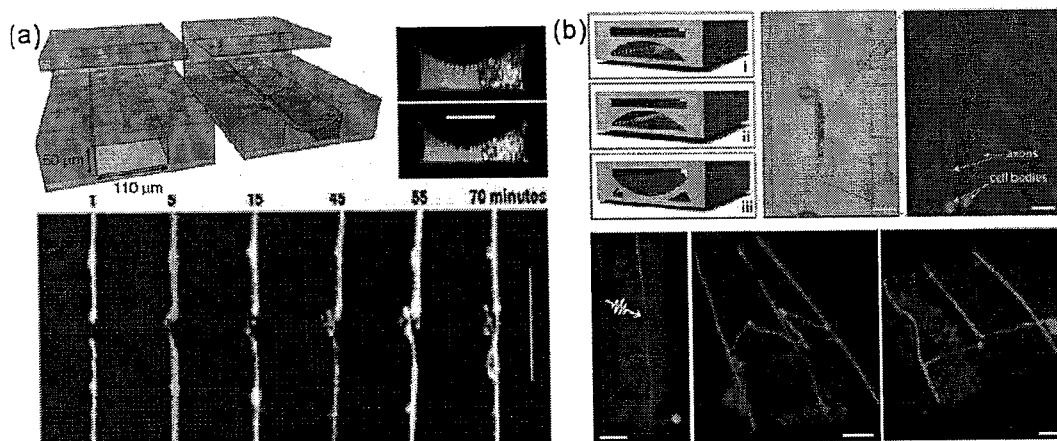


图 1-23 在基于微阀结构的微流控芯片上对线虫实施激光轴突切断术，并研究线虫的神经再生过程[80, 82]。

Fig. 1-23 In vivo *C. elegans* neuron ablation and regeneration studies on microvalve-based microfluidic chips.

1.4 本论文涉及的基于液滴微流控芯片的线虫帕金森病药理学模型研究的工作概述

本论文设计并制作两个集成化液滴微流控芯片，并将其应用于帕金森病药理学模型线虫的运动行为、神经元特征及氧化应激水平的研究，旨在为进一步的单个线虫水平高通量抗帕金森病药物筛选奠定基础。

论文共分三章，第一章为文献综述，对当前微流控芯片平台上的线虫神经生物学研究进展做了简要总结和评论。第二章介绍液滴微流控芯片用于神经毒素诱导下线虫运动缺陷行为的研究。该章首先构建一个基于液滴的微流控芯片平台，可以连续进行液滴生成、单个线虫包裹、液滴固定以及线虫行为监测等多个实验步骤；在该平台上，以微液滴作为单个线虫的微存储器，考察不同浓度 MPP⁺对单个线虫运动行为的影响。该工作首次将液滴引入微流控芯片线虫研究，显示将高通量液滴用于单个线虫水平帕金森病药物筛选的前景。第三章介绍液滴微流控芯片用于神经毒素诱导下帕金森病药理学模型线虫的运动行为、神经元特征及氧化应激水平研究。在上一章基础上，构建一个集成化双层液滴微流控芯片，该芯片采用一种全新的液滴浮力捕获方式，并增加用于线虫固定的楔形通道阵列，可以释放并固定包裹于液滴内的单个线虫，实现对其运动行为和荧光特征的连续监测。分别利用神经毒素 6-羟基多巴胺 (6-OHDA) 诱导的转基因虫株 UA57 和 CL2166 构建帕金森病药理学模型，考察单个线虫水平上的运动行为、多巴胺能神经元及氧化应激特征。该工作首次在微流控芯片上实现对线虫帕金森病模型的运动缺陷、神经元变性及氧化应激水平等三个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。图 1-24 为论文整体研究思路框图。

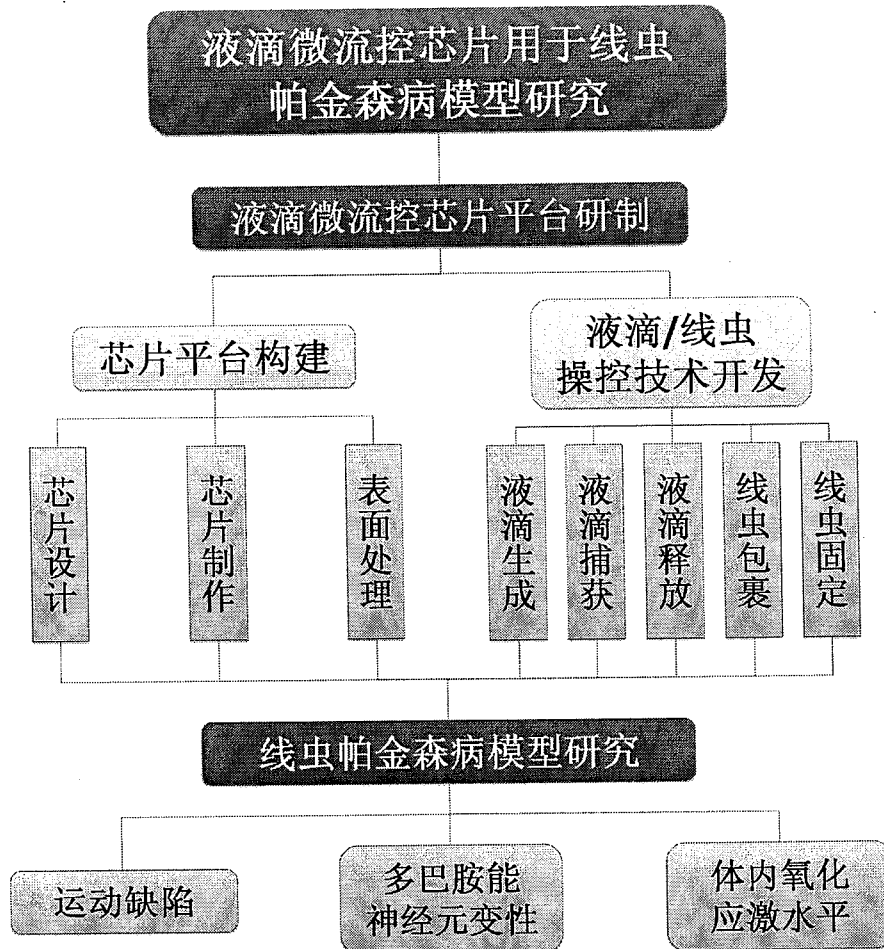


图 1-24 论文整体思路框图。

Fig. 1-24 Study workflow of the thesis.

参考文献

1. Guarente, L., Kenyon, C., Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature*, 2000, 408(6809): 255-262.
2. Hedges, S. B., The origin and evolution of model organisms. *Nature Reviews Genetics*, 2002, 3(11): 838-849.