

膜式微流控系统处理低温保护剂的 实验研究

王吉, 陈春, 邱栏兰, 蒋志豪, 周晓明

(电子科技大学机械与电气工程学院, 成都, 611731)

(Tel:15196655778, Email: zhouxm@uestc.edu.cn)

摘要: 随着干细胞等材料在临床和科研中的广泛应用, 低温保存面临着越来越多的微小体积对象, 这就对低温保护剂 (cryoprotectant agents, CPAs) 的添加/去除工作提出新的处理要求。研究提出一种基于微流控和膜分离技术的方法, 并基于该方法建立了膜式微流控系统。实验证明, 该方法可实现小体积样品细胞 CPAs 的平稳、可控添加/去除处理, 有望大幅度提高小体积生物样品 CPAs 处理的效率和效果。

关键词: 生物医学工程学; 低温保护剂; 微流控芯片; 膜分离技术

Experimental study of a membrane-based microfluidic system for processing cryoprotectant agents

Wang Ji, Chen Chun, Qiu Lanlan, Jiang Zhihao, Zhou Xiaoming,

School of Mechanical and Electrical Engineering, University of Electronic Science and Technology of

China, Chengdu 611731, China;

Abstract Along with the wide application of stem cells and other materials in clinical and scientific researches, cryopreservation faces a growing number of small volume objects. Some new requirements have been raised during adding/removing cryoprotectant agents (CPAs) for such small volume objects. In this study, a novel membrane-based microfluidic approach was presented. Accordingly, a membrane-based microfluidic system was designed and fabricated by microfluidics and membrane separation technique. Experiment results demonstrated that the system can achieve stable and controllable adding/removing CPAs for small volume samples, and it will greatly improve the efficiency and effectiveness of adding/removing CPAs for small volume biological samples.

Keywords biomedical engineering; cryoprotectant agents; microfluidic chip; membrane separation technique

0 引言

虽然生物材料可以在超低温下长期安全保存, 但保存过程中的低温环境有可能对生物材料造成一定的损伤, 即所谓的低温损伤^[1-13]。为避免或减小低温损伤, 常在低温保存过程中添加 CPAs, 以及在复苏冷冻生物材料后去除 CPAs^[9-14]。

为去除细胞 CPAs, VALERI 等^[15]陆续开发 ACP 系列的全自动细胞清洗仪, 在清洗冰冻解冻红细胞内的甘油时能够取得不错的效果; ARNAUD 等^[16]应用中空纤维膜建立了一套处理系统, 成功地应用于血小板中二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 的清洗处理; ZHOU 等^[17]发明的“灌注-超滤”式系统已经在红细胞低温保存中应用, 并取得了较大的成功。总的来说, 以上自动化系统都是针对特定处理对象特殊设计而成, 通用性有所限制, 尤其难

基金项目: 国家自然科学基金 (5167060552)

作者简介: 王吉, (1993—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 低温生物保存

以应用于干细胞、生殖细胞制品等微小体积的样品。目前，在针对这类微小样品低温保存中的 CPAs 处理环节仍然严重依赖手工，不仅效率非常低，而且容易造成细胞损失，保存效果也容易受到人为因素的影响。

近年来，许多研究者将微流控技术应用到 CPAs 添加/去除领域中，取得了一系列不错的成果^[18-22]。SONG 等^[21]提出的一种基于微流控技术的方法建立了 CPAs 添加/去除系统，提高了细胞的存活率；为提高细胞悬浮液中 DMSO 的去除效率，HANNA 等^[22]制作了垂直三流的微流体装置。ZHENG 等^[23]设计并制作了一款 CPAs 添加/去除微流控芯片，并将该芯片应用于细胞 CPAs 添加/处理，低温保存后，细胞活性相较于“多步法”提高 24%；为去除小体积细胞中的 CPAs，KANG 等^[24]开发出一套多步“稀释—过滤”微装置，有效提高了 CPAs 去除率以及细胞成活性。在一定程度上，上述装置在 CPAs 的添加/去除上提高了小样品对象的处理效率。但一方面依赖样品与处理溶液的直接接触，难以避免局部的渗透压突变和细胞损伤，另一方面，对于大体积细胞 CPAs 处理，处理通量有限。

为解决微小体积生物材料的 CPAs 添加/去除问题，研究提出一种基于微流控和膜分离技术的 CPAs 添加/去除方法，其具体方案为：利用微流控技术和膜分离技术分别在微流控芯片上构造膜分离系统，通过微流体在半透膜两侧的跨膜传质实现添加或去除 CPAs，以实现平稳可控的 CPAs 处理，并避免产生额外的机械损伤。

1 材料与方法

1.1 膜式微流控系统

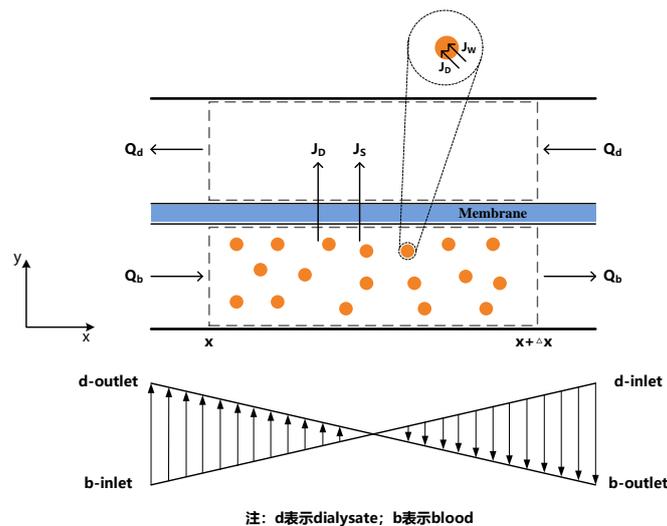


图1 CPAs 处理原理示意图

膜式微流控系统实现 CPAs 添加/去除过程的原理如图 1 所示。在 CPAs 添加过程中， Q_b 表示下侧微流道中溶液流动方向及流量， Q_d 表示上侧微流道芯片中含有 CPAs 溶液的流量和流动方向，在浓度差和压力差作用下，CPAs 透过微孔滤膜进入细胞悬浮液中，随着时间变化细胞悬浮液中 CPAs 的浓度不断上升，最终实现添加 CPAs 的目的；在 CPAs 去除过程中， Q_b 表示含有 CPAs 的细胞悬浮液的流动方向和流动速度， Q_d 表示置换液的流动方向和流动速度，在浓度差和压力差作用下，细胞悬浮液中的 CPAs 透过膜进入置换液中，CPAs 浓度不断下降，最终达到去除 CPAs 的目的。基于上述原理，设计并加工了一种一种三明治结构的膜式微流控系统，并进行了初步的无细胞溶液模拟实验，以期掌握该方法的 CPAs 跨膜传质特点和处理过程的控制方法。

膜式微流控芯片的具体的结构如图 2，其由一片微孔滤膜（CN-CA）、一片 PMMA 双面胶以及两片加工有微流道特征的 PMMA 芯片（芯片 A 与芯片 B）构成。

基金项目：国家自然科学基金（5167060552）

作者简介：王吉，（1993—），男，硕士研究生，主要研究方向：低温生物保存

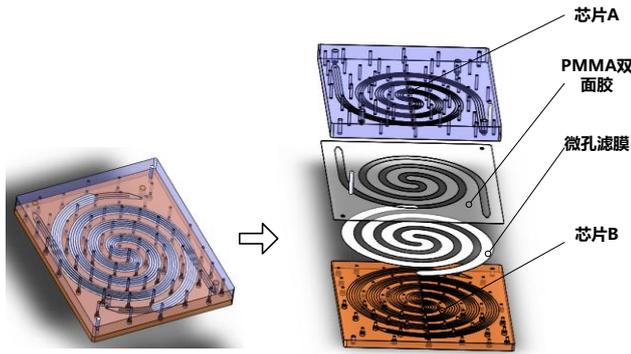


图2 芯片3D结构示意图



图3 芯片装配实物图

其具体的装配步骤如下：将由激光雕刻机切割后的微孔滤膜放置于芯片 B 的预留埋膜槽中，然后将 PMMA 双面胶一面与芯片 A 粘接，另一面在定位针的导向作用下与芯片 B 相粘接；将螺钉于预留位置处拧紧，这就形成 CPAs 处理的芯片模块如图 3 所示。在双面胶和螺钉的粘性力以及机械预紧力的作用下，装置的密封性能得到保证，从而有效避免溶液的泄露；再将鲁尔外螺纹接头拧入上下两层芯片微流道对应进/出口处，最后，通过鲁尔接头套装以及硅胶管与装载于注射泵上的注射器相连，形成膜式微流控 CPAs 处理实验平台（如图 4、5 所示）。

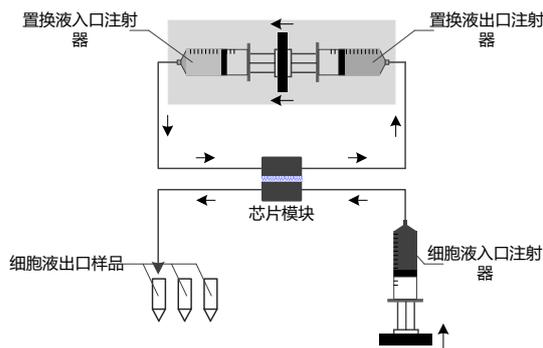


图4 膜式微流控系统操作示意图



图5 膜式微流控系统实验平台

1.2 CPAs 处理实验

在膜式微流控系统装配前，要将微流控芯片放入 75% 医用酒精消毒，然后再放入 0.9% 的 NaCl（河北天成药业股份有限公司）溶液中进行清洗，自然晾干备用。在进行实验测试之前，需要使用双通道注射泵（TSY-BYZ-810，长沙比杨医疗器械有限公司）往上下两层微流道中注入 0.9%（w/v）NaCl 溶液进行流道的清洗。在 CPAs 添加实验过程中，采用 0.9%（w/v）NaCl 代替细胞悬浮液，10%（v/v）DMSO（分析纯，无锡市亚泰联合化工有限公司）为置换液；在 CPAs 去除实验过程中，采用 10%（v/v）DMSO 溶液代替含有 10%（v/v）DMSO 的细胞悬浮液，0.9%（w/v）NaCl 为置换液。之所以采用这样的替代方法，一方面，本研究的主要目的在于探索基于微流控和膜分离原理的微流控系统的传质特性，作为处理流程优化的基础；另一方面，应用无细胞溶液更便于浓度的测量和分析。其具体实验过程如下：

步骤 1：上层微流道中溶液由一台双向推拉注射泵（LSP01-1C，保定兰格恒流泵有限公司）控制，下层微流道中溶液由一台双通道注射泵控制，CPAs 处理过程中，须分别设置对应注射泵的注射流量，双通道注射泵推动模拟细胞液入口注射器以 Q_b 的流速将模拟细胞悬浮液溶液注入下层微流道；双向推拉注射泵推动置换液入口注射器以 Q_d 的流速将置换液注

基金项目：国家自然科学基金（5167060552）

作者简介：王吉，（1993—），男，硕士研究生，主要研究方向：低温生物保存

入上层微流道;

步骤 2: 由于置换液侧由双向推拉注射泵控制, 故置换液出口溶液抽出溶液速度与注入速度保持一致, 并设置模拟细胞悬浮液出口为自由出口;

步骤 3: 在实验采样周期的不同时间点, 用 0.5ml EP 管收集由模拟细胞悬浮液出口处流出溶液 20ul, 每组实验条件重复 3 次, 最后, 样品溶液用露点渗透压仪 (Vapro[®] 5600, Wescor, 美国) 测试溶液渗透压值, 由渗透压值反应装置添加/去除 CPAs 效果;

步骤 4: 每次实验结束, 用去离子冲洗芯片及管路至少 15min, 分析整理实验数据。

2 结果

CPAs 添加/去除过程是一对逆向过程, 主要在于置换液成分不同, 添加/去除过程中, 置换液分别为含 CPAs 的溶液和低渗溶液。细胞经历低温保存后其细胞膜的脆性增加, 且细胞承受收缩变化能力要强于膨胀变化, 则细胞损伤更易发生于 CPAs 去除阶段^[25]。本文主要是研究膜式微流控系统去除 CPAs 过程, 其所涉及的方法和结论很容易应用到 CPAs 添加过程中。

为探究膜式微流控系统中在置换液与模拟细胞悬浮液逆向流动情况下, 跨膜传质情况, 进行了相应实验。具体的实验条件如下: 微孔滤膜: 混合纤维素酯 0.22um; 溶液成分: “细胞液”为 10% (v/v) DMSO 溶液, 置换液为 0.9% (w/v) NaCl; 流量设置: $Q_b=60$ ml/h, Q_d 分别为 60, 120, 240, 360 ml/h (注: $f=Q_d/Q_b$), 按照如图 5 所示系统进行实验, 随着时间变化记录“细胞液”出口处的渗透压值变化情况, 如图 6 所示。

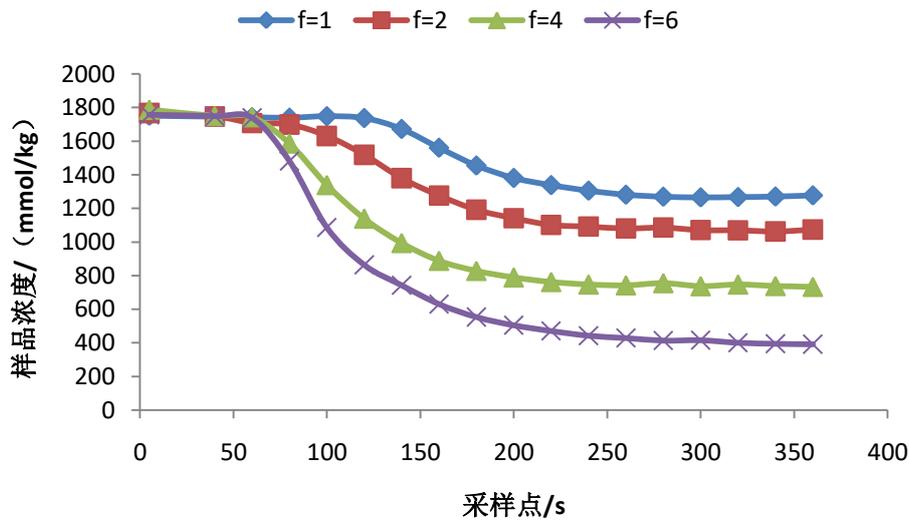


图 6 去 DMSO 溶液浓度变化情况

3 分析与讨论

由图 6 可知, 在细胞悬浮液与置换液逆向流动情况下, “细胞液”中的 DMSO 由于浓度差和压力差作用下跨膜物质交换进入置换液, 置换液中溶液浓度不断升高, 相应细胞液侧溶液浓度不断降低。在“细胞液”流量为 60 ml/h 不变情况下, 置换液流速越快, CPAs 去除效率越高。当 $Q_b=60$ ml/h, $Q_d=360$ ml/h 时, 10% (v/v) DMSO 溶液一次通过 CPAs 处理芯片, 溶液渗透压值从 1757mmol/kg 左右, 经过 5min 左右处理, 其溶液渗透压值下降至 392mmol/kg 以下的范围内, 浓度接近于等渗溶液水平, 则“细胞液”中的 DMSO 已经被完全去除。在该流量条件下, 处理 15ml^[26]含 CPAs 细胞悬浮液, 一次通过 CPAs 处理芯片, 整个过程仅需要 20min。并且从渗透压值的变化过程来看, 能够有效避免渗透压突变给细胞造

基金项目: 国家自然科学基金 (5167060552)

作者简介: 王吉, (1993—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 低温生物保存

成损伤。根据本实验系统的特点,可以通过控制“细胞液”和置换液的入口速度实现对 CPAs 添加/去除效率的控制,综上所述,本文设计的膜式微流控系统能实现 CPAs 添加/去除过程的安全、平稳、可控。

4 结论

为解决生殖细胞、干细胞等小体积样品细胞的 CPAs 添加/去除问题,提高小体积细胞经过 CPAs 添加/去除过程之后的细胞存活率,本文提出一种新的基于微流控和膜分离技术的 CPAs 添加/去除方法,并基于该方法建立一套完整膜式微流控系统,用于小体积样品的 CPAs 添加/去除处理。通过实验证明本文提出的方法有以下优点:所提方法能有效实现面向小体积样品的 CPAs 添加/去除处理,能通过对“细胞液”和置换液入口速度的控制实现对 CPAs 添加/去除过程的控制,而且在整个添加/去除的过程中,溶液浓度上升/下降的变化曲线是平滑的,可实现平稳高效的 CPAs 处理;微流控技术的应用能够操控微流体,实现对微小体积对象的处理,膜分离技术的应用可以避免 CPAs 与细胞直接接触而导致的细胞渗透压失衡,通过微流控技术和膜分离技术的有机结合能够有效解决面向微小体积生物材料样品的 CPAs 添加/去除问题;相对于其它的 CPAs 处理方法,本文提出的膜式微流控系统,可以实现处理过程的连续化,处理效率高、可控性强,而且闭合系统能够减少外界和人工操作污染。

参考文献

- [1] POLGE C, SMITH A U, PARKES A S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures[J].*Nature*, 1949, 164(4172): 666-676.
- [2] 华泽钊, 任禾盛. 低温生物医学技术[M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [3] MERYMAN H T. Cryopreservation of living cells: principles and practice[J]. *Transfusion*, 2007, 47(5): 935-945.
- [4] BAUST J G, GAO D Y, BAUST J M. Cryopreservation: an emerging paradigm change[J]. *Organogenesis*, 2009, 5(3): 90-96.
- [5] HANNA J, HUBEL A. Preservation of stem cells[J]. *Organogenesis*, 2009, 5(3): 134-137.
- [6] MAZUR P. Freezing of living cells: mechanisms and implications[J]. *American Journal of Physiology*, 1984, 247(3):C125-C142.
- [7] YANG S, ÜNDAR A, ZAHN J D. A microfluidic device for continuous, real time blood plasma separation[J]. *Lab on A Chip*, 2006, 6(7): 871-880.
- [8] SCHERR T, PURSLEY S, MONROE W T, et al. A numerical study on distributions during cryoprotectant loading caused by laminar flow in a microchannel[J]. *Biomicrofluidics*, 2013, 7(2): 024104.
- [9] MATA C, LONGMIRE E, McKENNA D, et al. Cell motion and recovery in a two-stream microfluidic device[J]. *Microfluidics & Nanofluidics*, 2010, 8(4): 457-465.
- [10] SCHERR T, PURSLEY S, MONROE W T, et al. A numerical study on the loading of cryoprotectant cocktails-on-a-chip. Part I: interacting miscible viscous fluids[J]. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 2014, 78(11): 1284-1291.
- [11] SCHERR T, PURSLEY S, MONROE W T, et al. A numerical study on the loading of cryoprotectant cocktails-on-a-chip. Part II: the cellular experience[J]. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 2014, 78(11): 1292-1299.
- [12] LI Y H, WANG F, WANG H. Cell death along single microfluidic channel after freeze-thaw treatments[J]. *Biomicrofluidics*, 2010, 4(1): 014111.
- [13] MAHMOUD M, SHU J, ZHANG X H, et al. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current

基金项目: 国家自然科学基金(5167060552)

作者简介: 王吉, (1993—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 低温生物保存

-
- problems and future perspectives[J]. *Science China Life Sciences*, 2014, 57(9): 903-914.
- [14] 周楠峰, 杨云, 周新丽. 微流体技术在低温保存领域的研究进展[J]. *生物医学工程学杂志*, 2015(3): 702-706.
- [15] VALERI C R, RAGNO G. Cryopreservation of human blood products[J]. *Transfusion and Apheresis Science*, 2006, 34(3): 271-287.
- [16] ARNAUD F, KAPNIK E, MERYMAN H T. Use of hollow fiber membrane filtration for the removal of DMSO from platelet concentrates[J]. *Platelets*, 2003, 14(3): 131-137.
- [17] ZHOU X M, LIU Z, SHU Z Q, et al. A dilution-filtration system for removing cryoprotective agents[J]. *Journal of Biomechanical Engineering*, 2011, 133(2): 021007.
- [18] 张晓光, 赵刚, 丁卫平, 等. 透析法去除红细胞渗透性低温保护剂的实验研究[J]. *中国生物医学工程学报*, 2008, 27 (1): 156-159.
- [19] 丁卫平, 何立群, 赵刚, 等. 一个新颖的中空纤维人工肾传质理论模型[J]. *科学通报*, 2003, 48 (15): 1642-1646.
- [20] 胡相华, 张立志, 蓝建华, 等. 中空纤维透析膜的模拟传质实验与理论模型分析[J]. *膜科学与技术*, 2015, 35 (1): 70-74.
- [21] SONG Y S, MOON S J, HULLI L, et al. Microfluidics for cryopreservation[J]. *Lab on a Chip*, 2009, 9(13): 1874-1881.
- [22] HANNA J, HUBEL A, LEMKE E. Diffusion-based extraction of DMSO from a cell suspension in a three stream, vertical microchannel[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2012, 109(9): 2316-2324.
- [23] Zheng Y, Zhao G, Zhang Y, et al. On-chip loading and unloading of cryoprotectants facilitate cell cryopreservation by rapid freezing[J]. *Sensors & Actuators B Chemical*, 2017.
- [24] Kang Y, Zou L, Qiu B, et al. Unloading of cryoprotectants from cryoprotectant-loaded cells on a microfluidic platform[J]. *Biomedical Microdevices*, 2017, 19(2):15.
- [25] 周晓明. 生物材料低温保存中若干机械工程问题的理论和实验研究[D]. 电子科技大学, 2010.
- [26] Fleming K K, Hubel A. Cryopreservation of hematopoietic and non-hematopoietic stem cells[J]. *Transfusion & Apheresis Science*, 2006, 34(3):309.

基金项目：国家自然科学基金（5167060552）

作者简介：王吉，（1993—），男，硕士研究生，主要研究方向：低温生物保存