



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/eng](http://www.elsevier.com/locate/eng)



Research

New Technology of Tumor Diagnosis and Treatment—Article

## 三维仿生支架平台的刚度和层尺寸对癌细胞分离的影响

张维冠, 刘子玉, 彭慧芝\*

Department of Electrical Engineering, Center for Biosystems, Neuroscience, and Nanotechnology, City University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China

### ARTICLE INFO

### 摘要

#### Article history:

Received 6 May 2020

Revised 23 July 2020

Accepted 1 September 2020

Available online 5 November 2020

#### 关键词

细胞分离

细胞迁移

鼻咽癌 (NPC)

3D 支架平台

癌细胞分离是癌症诊断和治疗的理想手段。除了生化方法,工程化平台是根据癌细胞响应周围微环境物理变化的独特特性将癌细胞与正常细胞分离的有效选择。本研究根据精确控制的设计参数(包括刚度、层数和结构布局),开发了三维(3D)仿生支架平台,用于分离鼻咽癌(NPC43)细胞与永生鼻咽上皮(NP460)细胞。支架平台上NPC43细胞和NP460细胞的迁移特征表明,NPC43细胞可以挤进10 μm宽、15 μm深的沟槽,而NP460细胞不能。迁移行为的不同主要是由细胞与周围微环境的交互作用不同所致。NPC43细胞具有丝状伪足样突触,而NP460细胞呈片状形态。使用这些3D仿生平台进行研究发现,在较硬的双层支架平台[顶层为40/10 μm沟脊/沟槽(R/T)栅格,底层为20/10 μm R/T网格]上,NPC43细胞与NP460细胞的分离效率可达89%。此外,通过添加活性条件培养基(ACM)可使细胞具有更高的运动性和变形性,从而将分离效率进一步提高到93%。这些结果表明,研究人员可以利用设计适当的仿生工程化平台分离癌细胞和正常细胞,从而辅助实现癌症诊断和治疗。

©2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. 引言

肿瘤是一种复杂的异质组织,由充满癌细胞和非癌间质细胞的细胞外基质(ECM)组成。不同种类的间质细胞,包括成纤维细胞、免疫细胞、巨噬细胞和内皮细胞,与周围癌细胞共存并相互作用[1–5]。将癌细胞从异质细胞群中分离在癌症诊断、监测和治疗中具有重要意义。生物标志物通常用于识别不同细胞类型,例如,互补荧光团偶联抗体与目标细胞结合,以使目标细胞能被荧光检测器识别[6–9]。另外,通过将抗体偶联磁珠与目标细胞上的特定蛋白结合,被标记细胞即可通过外加磁场对磁珠施加磁力来进行分选[10–13]。同时,也可以通过手动挑选细

胞的方式进行单细胞分离[14–16]。在倒置显微镜下,可使用显微操纵器和微量吸液管提取特定的细胞。此外,微流控系统亦被广泛用于细胞分选,它们具有流量控制精准、器械体积小和样品消耗少的优点[17–20]。除了生物标志物外,细胞尺寸[21–23]、形状[24–26]、变形性[27–28]、密度[29]、极化性[30–31]和反射指数[32–33]等细胞特性均可被用于在微流控系统中借助微流体力来实现分离细胞。例如,通过在微流控系统中设计漏斗状微结构可以阻断较大或较坚硬的细胞,而较小或可变形性较大的细胞可在振荡流下通过[34–35]。虽然上述方法可实现细胞的高效分离[36],但通常需要生物标志物、抗体、磁场或微流体等额外设置或施加额外力,这使得分离过程更复杂、成

\* Corresponding author.

E-mail address: [pang@cityu.edu.hk](mailto:pang@cityu.edu.hk) (S.W. Pang).

本更高。

除利用额外生化试剂、外部磁力或微流体来分离细胞, 还可利用细胞在特别设计的平台上的交互作用来实现其分离。此前, 我们课题组曾探究了用于控制细胞迁移与分离的具有不同设计的单层平台[37–38]。研究发现, 虽然单层平台能够有效地引导细胞迁移, 但它们无法分离癌细胞和正常细胞。因此, 三维平台被提出用于实现癌细胞分离。此外, 由于真实的ECM是三维结构, 因此三维平台也可以更好地模拟人体组织中的ECM。同时, 结合三维平台上的微流控通道, 被分离的细胞可被单独收集并用作进一步研究。因此, 本文将重点研究利用参数可控的三维支架结构平台将鼻咽癌(NPC)细胞从鼻咽(NP)上皮细胞中分离。NPC被认为是一种具有高度侵袭性和转移性癌症, 患者在早期往往不会表现出明显的症状[39–41]。与其他类型的癌症不同, NPC与爱泼斯坦-巴尔二氏病毒(EB病毒)密切相关。然而, 当在体外培养NPC细胞时, EB病毒游离基因往往会减少[42–43]。直至最近, 一系列稳定的NPC细胞株才被成功建立[44]。因此, 对NPC细胞的迁移行为进行体外研究, 并开发在无生化试剂或外力作用的情况下用于分离癌细胞的平台具有重要的意义。

本文中, 我们设计并制备了一系列三维支架结构平台, 并通过NPC细胞固有的形态特征、迁移特性以及与周围微环境的不同交互作用来实现NPC43细胞与永生化NP460细胞的分离。NP460细胞和NPC43细胞尺寸约为15  $\mu\text{m}$ 。当在单层栅格平台(沟槽宽10  $\mu\text{m}$ , 深15  $\mu\text{m}$ )上培养这些细胞时, 由于平台上的沟槽宽度小于细胞尺寸, 这些细胞几乎不能挤进10  $\mu\text{m}$ 宽的沟槽。因此, 通过设计具有不同尺寸、布局 and 材料特性的三维支架平台, 使尺寸相似的NP460细胞和NPC43细胞可以根据它们是否能迁移进入狭窄的沟槽而实现分离。当平台刚度、多层布局和层尺寸适当时, NPC43细胞有85%的概率挤进10  $\mu\text{m}$ 宽的沟槽, 而NP460细胞仅有10%的概率。此外, 当NPC43细胞因活性条件培养基(ACM)的刺激而具有更高的运动性时, 它们有更大的概率挤进10  $\mu\text{m}$ 宽的沟槽, 从而实现更高的细胞分离效率。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 工程支架平台的制备

单层和双层支架平台均采用具有生物相容性的弹性体材料[聚二甲基硅氧烷(PDMS)]制备。单层平台采用之前所报道[37–38]的复制模塑技术制备。双层平台的制备流程如图1所示, 包括分别制备顶层和底层, 然后用氧气

等离子体处理这两层, 接着通过逆向压印将两层叠在一起。底层的制备方式与单层支架平台相同, 如图1(a)所示。在硅(Si)栅格模具上涂一层三氯(1H,1H,2H,2H-全氟辛基)硅烷(FOTS)抗黏层后, 将PDMS混合物浇铸在模具上, 并在80  $^{\circ}\text{C}$ 的加热板上持续固化6 h。按照5:1、10:1和30:1(质量分数)三种混合比例, 使用不同的预聚物基料和固化剂(美国Dow Corning Sylgard 184)对PDMS的刚度进行调控, 并使用纳米压痕仪(美国Hysitron TI 700 Ubi)对不同样品的刚度进行表征。对于顶层的制备, 使用涂有FOTS[表面能:  $(71 \pm 3) \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ]的硅栅格模具与涂有抗黏层3-甲基丙烯酰氧基丙基三氯硅烷(MOPTS)和FOTS(混合比例为4:1)[表面能:  $(23 \pm 3) \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ]并浇筑PDMS的另一个硅基板, 逆向压印制成。然后使用氧气等离子体处理顶层和底层1 min[氧气流速为20 sccm(1 sccm =  $1 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ )、腔室压力为80 mTorr(1 mTorr = 0.133 Pa)、射频(RF)功率为60 W]。之后, 将上下两层的栅格状结构垂直叠放, 实现两层PDMS的键合。在80  $^{\circ}\text{C}$ 烘烤10 min后, 将双层支架平台从硅基板上剥离以完成制备。

### 2.2. 细胞培养

NP460细胞和NPC43细胞均由S. W. Tsao团队的Lin等[44]研制。NP460细胞的培养基采用两种培养基混合(混合比例为1:1): EpiLife培养基(美国Gibco), 充分添加1% EpiLife成分确定的生长添加剂(EDGS; 美国Gibco); 成分确定的角质细胞无血清培养基(1 $\times$ ; 美国Gibco), 充分添加0.2%成分确定的角质细胞生长添加剂(美国Gibco)。NPC43细胞在洛斯维·帕克纪念研究所(RPMI) 1640培养基(1 $\times$ ; 美国Gibco)中培养, 该培养基含10%胎牛血清(FBS)和2  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  0.2%的ROCK抑制剂Y-27632(25 mg; 瑞士ENZO)。NP460细胞和NPC43细胞的培养基均加入1%抗真菌抗生素(美国Gibco; 每毫升青霉素G钠100个单位, 100  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素和0.25  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 两性霉素B), 以避免污染。培养基每两天更换一次, 细胞每五天传代一次。

### 2.3. 延时成像和免疫荧光成像

三维支架平台键合在直径为35 mm的共聚焦玻璃培养皿上用以成像。在细胞接种前, 使用氧气等离子体处理平台1 min(氧气流速为20 sccm、腔室压力为80 mTorr、RF功率为60 W)形成亲水表面, 以加强细胞在平台上的附着性。表面经处理后, 立即分别以每毫升 $7.0 \times 10^4$ 个细胞和每毫升 $1.1 \times 10^5$ 个细胞的细胞密度(体积为2 mL)将其接种到单层和双层平台上, 然后置于培养箱中培养6 h。

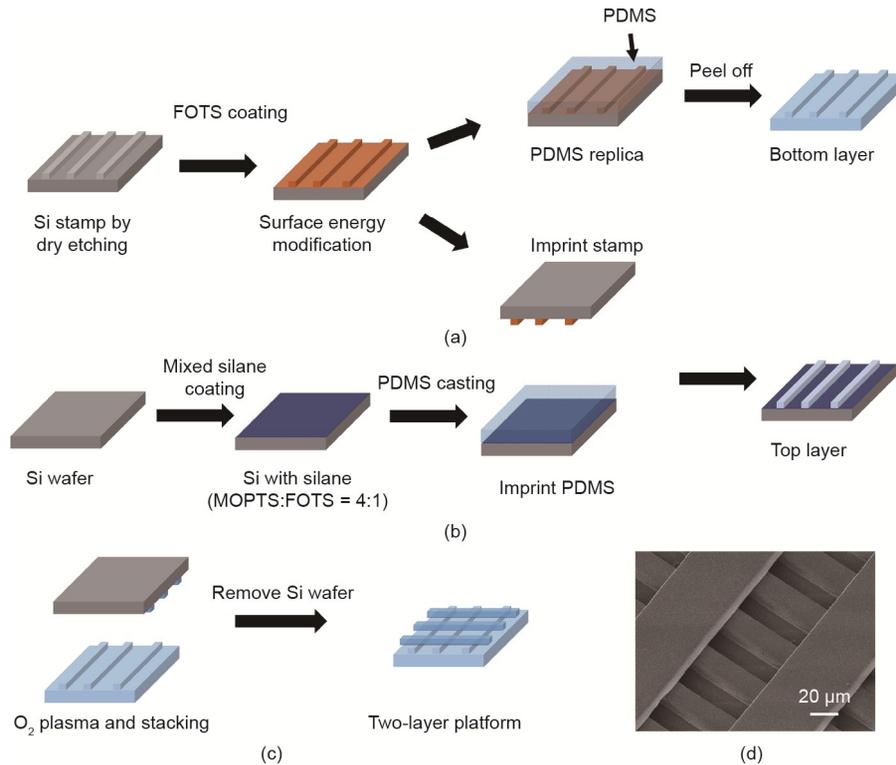


图1. 双层平台的制备流程。(a) 涂有FOTS的硅模具用于PDMS的图案复制。(b) 涂有混合硅烷的硅片及压印后具有图案的PDMS。(c) 经氧气等离子体处理后, 将两个有图案的PDMS层叠放在一起, 键合形成双层平台。(d) 双层平台的显微图像。FOTS: 三氯(1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-全氟辛基)硅烷; MOPTS: 3-甲基丙烯酰氧基丙基三氯硅烷。

之后, 将培养基更换为混合培养基[细胞培养基与二氧化碳(CO<sub>2</sub>)非依赖培养基18045-088(美国英杰)以1:1的比例混合], 该混合培养基添加了10% FBS、1%青霉素-链霉素(10 000 U·mL<sup>-1</sup>; 美国Gibco)和1% Gluta-MAX(100×; 美国Gibco), 以提供不需要CO<sub>2</sub>培养箱的环境。然后使用尼康Eclipse Ni-E正置电动显微镜(日本)每5 min拍摄一次延时图像, 持续15 h。利用异硫氰酸荧光素和四乙基异硫氰酸罗丹明成像的功能在同一显微镜下捕捉活细胞免疫荧光图像。

#### 2.4. 数据分析

通过美国国立卫生研究院(NIH)的ImageJ软件(美国1.50i版, 配有手动跟踪插件)追踪细胞迁移速度和轨迹。在围绕细胞的形状进行标记后, 通过ImageJ软件的测量功能完成细胞形态分析, 并计算细胞面积、周长及椭圆拟合长轴和短轴的长度。在延时成像过程中, 分裂、死亡或与其他细胞接触的细胞不纳入分析。

细胞圆度( $R$ )计算如下:

$$R = \frac{A}{\pi \times [C/(2\pi)]^2} \quad (1)$$

式中,  $A$ 为投影面积;  $C$ 为细胞的周长。

为了计算细胞形状的纵横比, 在细胞上拟合一个短轴

为 $a$ 和长轴为 $b$ 的椭圆, 并通过计算长短轴之比( $b/a$ )获得细胞形貌的纵横比。组间统计学差异采用单因素方差分析(ANOVA)检验进行分析,  $p < 0.05$ 表示显著水平。所有结果以平均值±均数标准误(SEM)表示。

细胞分离效率定义为: NPC43细胞进入顶层沟槽或底层网格的概率除以NPC43细胞和NP460细胞进入该特定位置的概率。

#### 2.5. 扫描电子显微镜法

用10×磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗平台上的细胞2次(每次5 min), 并用4%多聚甲醛固定15 min。然后逐渐从30%、50%、70%、80%、90%、95%到100%提高乙醇浓度, 对细胞进行脱水; 将细胞放入临界点干燥仪中保持3 h。然后在干燥的样品上蒸镀一层薄薄的金, 以避免观测成像过程中的荷电, 之后将准备完成的样品置于扫描电子显微镜SU5000(日本Hitachi)中进行成像。

### 3. 结果和讨论

#### 3.1. 单层平台上的细胞分离

##### 3.1.1. 平台刚度的影响

研究表明, 平台刚度会影响细胞行为, 比如迁移速

度、形态和增殖[45–48]。我们采用单层栅格平台（沟槽宽  $10\ \mu\text{m}$ ，深  $15\ \mu\text{m}$ ），并研究平台刚度对NP460细胞和NPC43细胞挤进狭窄沟槽概率的影响。这一概率可以通过细胞挤进  $10\ \mu\text{m}$  宽沟槽中的细胞数量除以细胞总数进行计算。分裂、死亡或与其他细胞接触的细胞不纳入统计学分析，以避免因细胞状态改变而引起的其他影响。平台刚度可以通过混合不同的PDMS基剂配比进行调控。图2（a）为不同PDMS混合比下的杨氏模量，结果表明混合比越大，杨氏模量越小，平台越柔软。

实验中，NP460细胞和NPC43细胞被分别接种到不同刚度的单层平台上，培养6 h后进行延时成像，共持续15 h。图2（b）显示，无论平台的刚度如何，几乎没有NP460细胞能挤进  $10\ \mu\text{m}$  宽的沟槽，而有23%的NPC43细胞在较硬的平台上进入狭窄沟槽，说明在较硬的平台上可将NPC43细胞与NP460细胞分离。图2（b）所示结果表明，使用30:1的PDMS基剂配比制备的平台刚度太小，不能用于分离NPC43细胞和NP460细胞。因此，我们选择使用5:1和10:1的PDMS基剂配比制备的相对较硬的平台进行进一步的研究和表征。图2（c）中的显微图像显示了在以PDMS基剂配比为5:1和10:1制备的平台上，NP460细胞和NPC43细胞的不同形态。通常，NP460细胞有较大的细胞体并向四周伸展；而NPC43细胞

则较小，并且，它们在较硬的平台上会沿栅格方向伸长，而在较软的平台上则更圆。图2（d）为细胞圆度统计结果，当为圆形时，圆度为1。由图可知，NP460细胞圆度与平台刚度没有显著相关性，而NPC43细胞在较硬的平台上伸得更长，进而有更高的概率挤进狭窄沟槽。

### 3.1.2. 图案形状和布局的影响

狭小开口中细胞接触面积可决定细胞迁移路径、方向或细胞形状变化。因此，我们建立了4种具有相同开口面积但不同孔隙形状（圆形、六边形、正方形和三角形）的单层平台，以研究NPC43细胞如何在不同形状的孔隙中移动，如图3（a）所示。圆形孔隙的深度为  $15\ \mu\text{m}$ ，直径为  $18\ \mu\text{m}$ ，这与细胞尺寸大致相当；因此，设计的4种孔隙形状均具有相同开口面积，大约为  $256\ \mu\text{m}^2$ 。在接种7 h后，细胞仍呈现圆形，但无法完全填满整个孔隙。因此，我们定义孔隙填充程度，即细胞面积除以孔隙面积，用来量化孔隙中细胞尺寸的变化。如图3（a）所示，NPC43细胞最初在不同形状的孔隙中的填充程度不同，但在22 h后可以填满不同形状的孔隙。这表明，NPC43细胞可以在不同形状的狭小孔隙中伸展其胞体，并填满整个孔隙。

由于上述特性，单层平台上的图案由栅格改为网格，以便在网格交叉处形成更多的接触面积，从而能够使更多

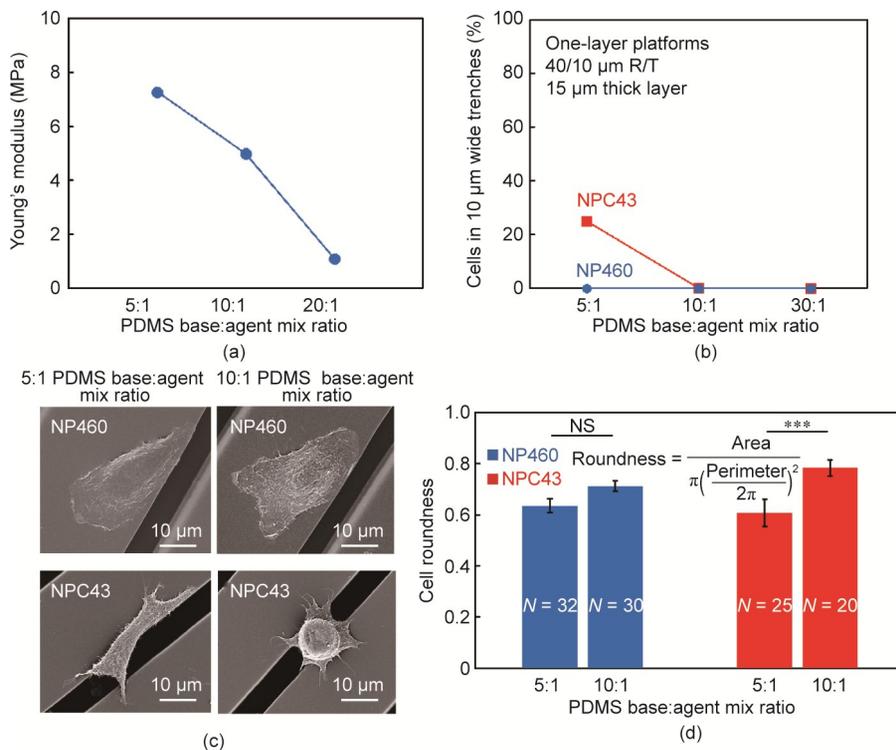


图2. (a) 不同基剂配比下的PDMS的杨氏模量（误差条 $\pm 12\ \text{kPa}$ ）；(b) NP460细胞和NPC43细胞在不同刚度的单层平台上迁移进入  $10\ \mu\text{m}$  宽沟槽的概率（误差条在1%以内）；(c) NP460细胞和NPC43细胞的显微图像；(d) 在不同刚度的单层平台上NP460细胞和NPC43细胞的形态。沟槽宽  $10\ \mu\text{m}$ ，深  $15\ \mu\text{m}$  [细胞数量 ( $N$ )  $> 20$ ; R/T: 沟脊/沟槽; NS: 不显著; \*\*\*:  $p < 0.001$ ]。

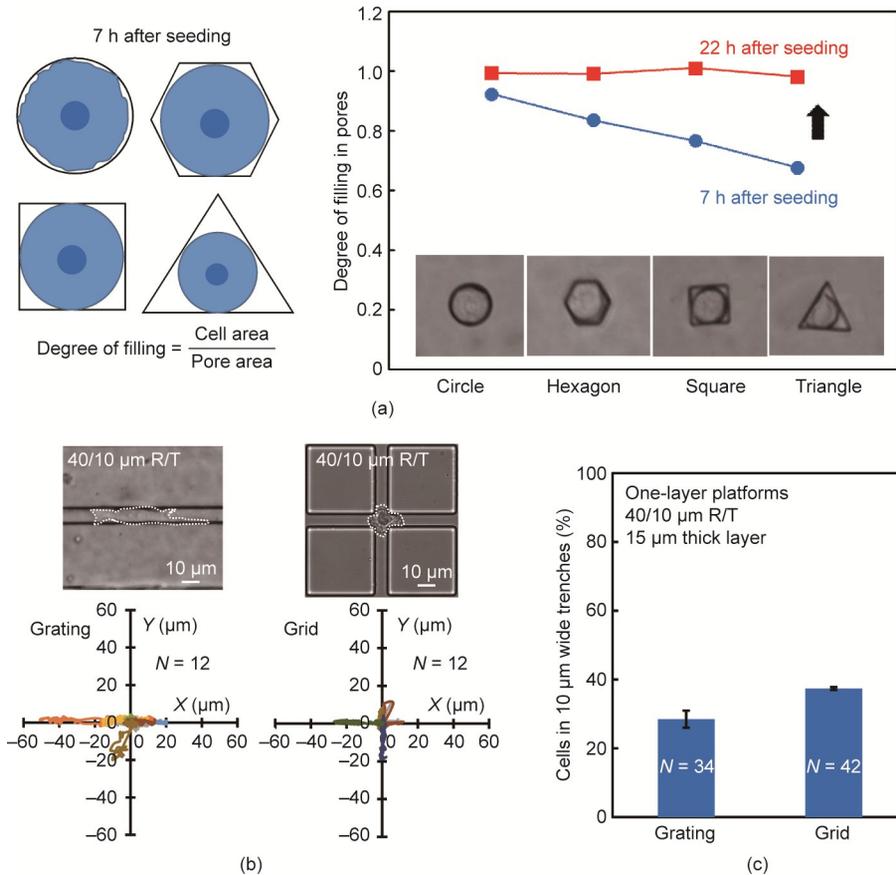


图3. (a) 形状不同但面积相同的15 μm深孔隙中NPC43细胞的填充程度。NPC43细胞在单层40/10 μm 沟脊/沟槽 (R/T) 栅格和网格平台上的迁移轨迹 (b) 和进入10 μm 宽沟槽的概率 (c)。沟槽深度为15 μm, PDMS基剂配比为5:1。

的NPC43细胞进入10 μm宽的沟槽实现更高的细胞分离效率。在单层栅格和网格平台上NPC43细胞的迁移轨迹如图3 (b) 所示。从图中可以看出, 栅格图案引导细胞沿着栅格方向迁移, 形态更显细长, 而网格图案使细胞集中在交叉处, 形态更圆。如图3 (c) 所示, 在网格平台上NPC43细胞挤进10 μm宽沟槽的概率更高, 这表明当底层采用网格设计时, NPC43细胞与NP460细胞的分离效率更高。

### 3.2. 双层平台上的细胞分离

#### 3.2.1. 平台刚度的影响

我们开发了多层三维平台用于细胞分离, 如图4 (a) 所示。双层支架平台可模拟组织中的由三维微环境构成的ECM, 以使细胞能够迁移。顶层和底层的图案均为40/10 μm 沟脊/沟槽 (R/T)、深度为15 μm的栅格。

如图4 (a) 所示, NP460细胞和NPC43细胞在平台上的形态并不同。NP460细胞呈片状伪足样, 细胞体展开。相反, NPC43细胞具有丝状伪足样突触, 细胞体伸长, 与周围微环境交互作用, 这使细胞更容易挤进10 μm

宽的沟槽。图示细胞形态代表了通过扫描电子显微镜在相同条件下独立三次成像中的绝大多数细胞形态 (两类细胞观察总数均超过30个)。图4 (b) 显示, 在双层平台上NP460细胞有10%的概率挤进10 μm宽的沟槽, 但在单层平台上这几乎不可能实现。另外, 在双层平台上NPC43细胞有更高的概率 (70%) 挤进狭窄沟槽。本文对以PDMS基剂配比为5:1和10:1制备的双层支架平台进行了刚度影响研究。如图4 (b) 所示, 不同的平台刚度对NP460细胞挤进狭窄沟槽的概率几乎没有影响, 但NPC43细胞在较硬的平台上挤进狭窄沟槽的概率提高了4%。NP460细胞和NPC43细胞的分离与它们在图案化平台上不同的细胞形态有关。当以PDMS基剂配比为5:1制备较硬双层支架平台 (40/10 μm R/T 栅格) 时, NPC43细胞挤进10 μm宽沟槽的概率比NP460细胞高64%。

#### 3.2.2. 底层结构的影响

为了进一步提高细胞分离效率, 将底层图案从栅格改为网格, 而将顶层栅格与底层垂直的方式放置, 如图5 (a) 所示。由于网格图案在交叉处提供了更多接触面积, 因此有更多的NPC43细胞能进入狭窄的沟槽。平台采用5:1的PDMS

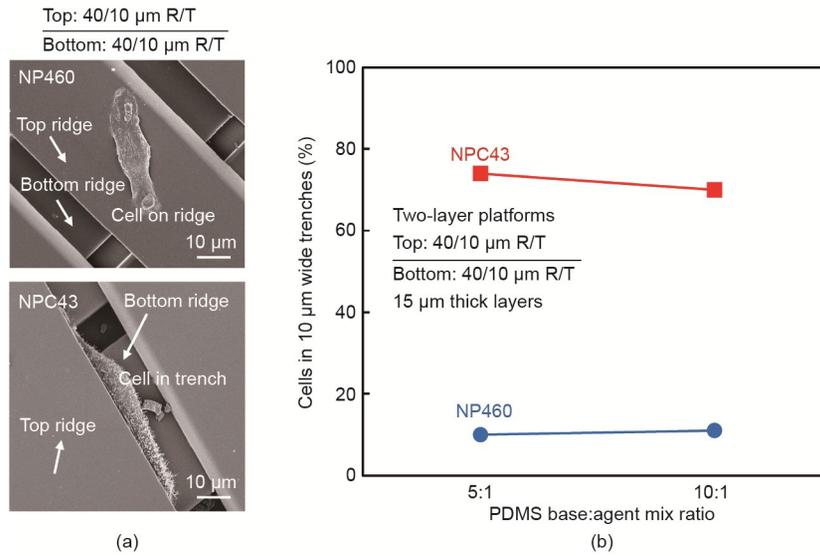


图4. (a) 在双层支架平台（顶层和底层为 $40/10\ \mu\text{m}$  R/T）顶层沟脊上的NP460细胞和顶层沟槽中的NPC43细胞的显微图像（在三次独立实验，且观察的每类细胞数目超过30个中的具有代表性的结果）；(b) NP460细胞和NPC43细胞在不同刚度的双层支架平台上挤进顶层 $10\ \mu\text{m}$ 宽沟槽的概率（误差条在1%以内）。每层的厚度均为 $15\ \mu\text{m}$ 。

基剂配比制成，顶层为 $40/10\ \mu\text{m}$  R/T栅格，底层为 $40/10\ \mu\text{m}$  R/T栅格或网格，深度都为 $15\ \mu\text{m}$ 。图5(b)显示，底层图案从栅格变为网格，对NP460细胞的迁移行为没有显著影响，但使NPC43细胞挤进 $10\ \mu\text{m}$ 宽沟槽的概率增加了3%。

此外，网格图案可以在交叉处提供更多的接触面积，从而使更多的NPC43细胞的丝状伪足样突触接触到底层的沟槽，进而使更多的NPC43细胞挤进 $10\ \mu\text{m}$ 宽的沟槽。为了研究细胞与底层沟槽的接触对NP460细胞和NPC43细胞分离的影响，我们将双层平台的顶层固定为 $40/10\ \mu\text{m}$  R/T栅格，而底层沟脊宽度设计为 $10\ \mu\text{m}$ 、 $20\ \mu\text{m}$ 、 $40\ \mu\text{m}$ 、 $80\ \mu\text{m}$ 和 $160\ \mu\text{m}$ 梯度变化，如图6(a)所示。随着 $10\ \mu\text{m}$ 宽的底层沟槽之间的距离逐渐增加，NPC43细胞突触更

难接触底层沟槽。图6(b)显示，随着沟脊宽度增加，NPC43细胞挤进狭窄沟槽的概率减小，这很可能是由于细胞与底层沟槽的接触减少所导致。

NPC43细胞在底层为 $20/10\ \mu\text{m}$ 和 $40/10\ \mu\text{m}$  R/T网格的双层支架平台上的显微图像如图6(c)所示。沟脊宽度越大， $10\ \mu\text{m}$ 宽沟槽之间的间隔也越大。NPC43细胞必须延展更长的突触才能到达底层沟槽。图6(d)显示，当底层网格较密集时，NP460细胞进入狭窄沟槽的概率相差不大，而NPC43细胞挤进 $10\ \mu\text{m}$ 宽沟槽的概率增加了8%。

将细胞形状拟合成椭圆并测量其长轴和短轴，进而可以量化细胞极化形状。通常，较细长的细胞形状更适合进入狭窄的沟槽。图6(e)比较了在底层为 $20/10\ \mu\text{m}$  R/T

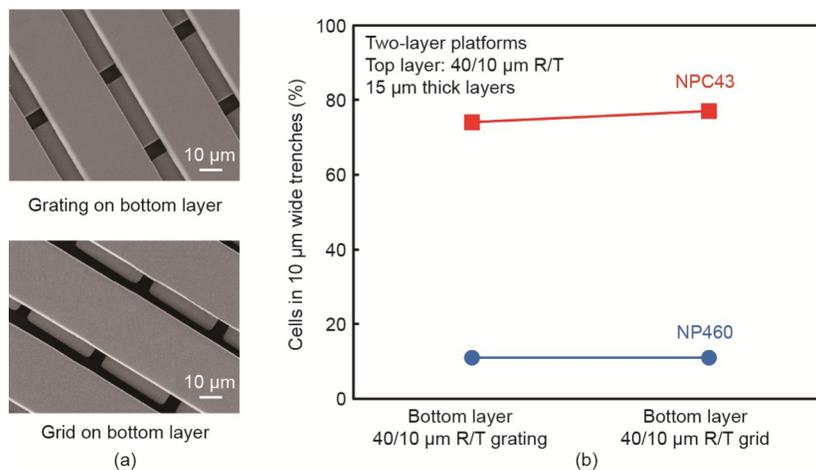


图5. (a) 底层为 $40/10\ \mu\text{m}$  R/T栅格和网格的双层平台的显微图像；(b) NP460细胞和NPC43细胞进入双层平台（底层为 $40/10\ \mu\text{m}$  R/T栅格和网格） $10\ \mu\text{m}$ 宽沟槽的概率（误差条在1%以内）。每层深度均为 $15\ \mu\text{m}$ ，PDMS基剂配比为5:1。

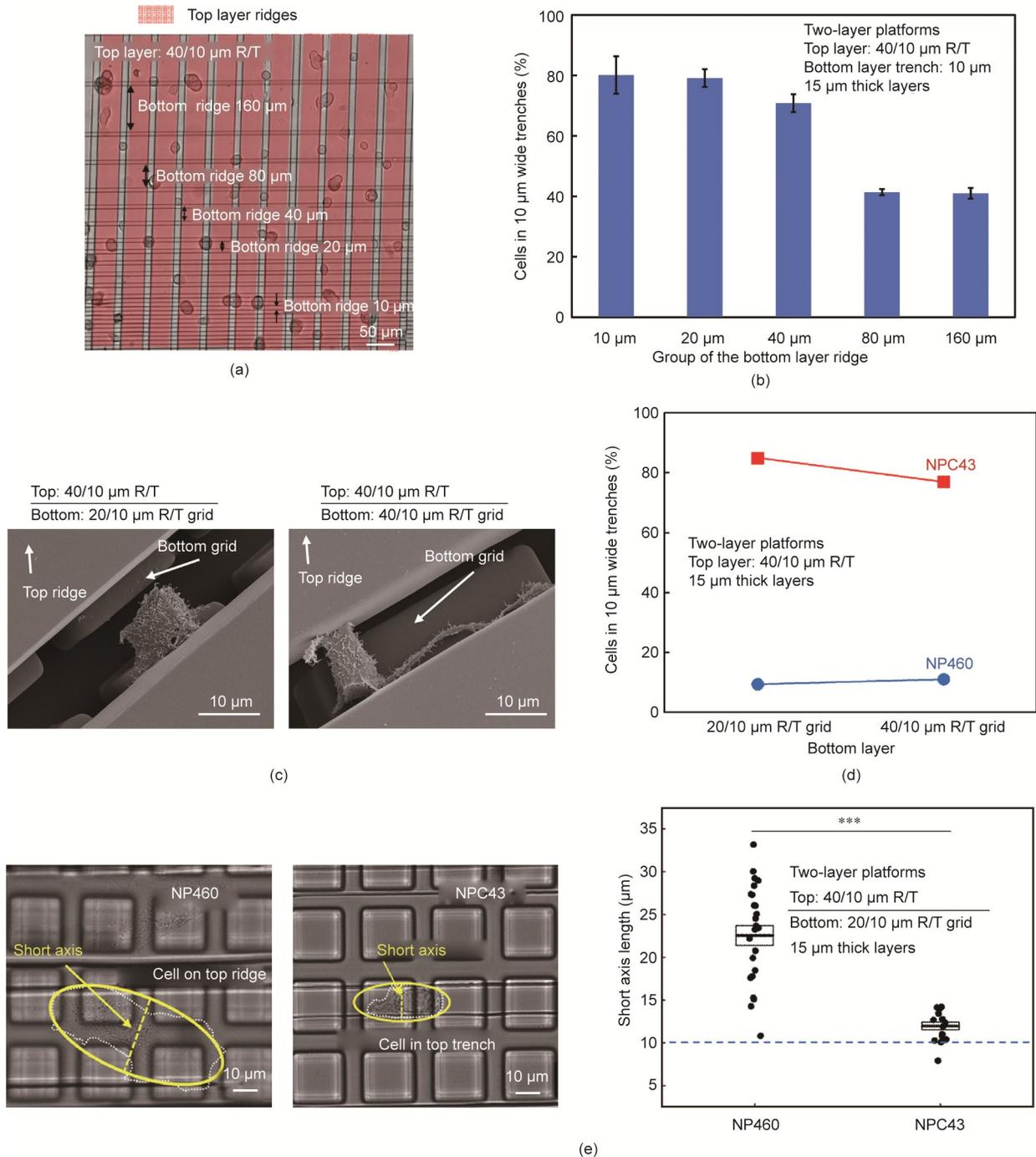


图6. 在底层沟脊宽度为10  $\mu\text{m}$ 、20  $\mu\text{m}$ 、40  $\mu\text{m}$ 、80  $\mu\text{m}$ 和160  $\mu\text{m}$ 的双层平台上NPC43细胞的显微图像 (a) 及其挤进沟槽的概率 (b)。所有沟槽宽均为10  $\mu\text{m}$ 。(c) NPC43细胞的突触接触双层平台底层网格沟槽的显微图像。(d) NP460细胞和NPC43细胞进入双层平台 (底层为20/10  $\mu\text{m}$ 和40/10  $\mu\text{m}$  R/T网格) 10  $\mu\text{m}$ 宽沟槽的概率 (误差条在1%以内)。(e) 底层为20/10  $\mu\text{m}$  R/T网格的双层平台上NP460细胞和NPC43细胞的拟合短轴长度。每层厚度为15  $\mu\text{m}$ , PDMS基剂配比为5:1 ( $N > 30$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ )。

网格结构的双层支架平台上, NP460细胞和NPC43细胞的短轴长度。从该图中可以看出, NP460细胞形貌在平台上更加分散, 平均短轴长度为22  $\mu\text{m}$ , 而NPC43细胞更细长, 平均短轴长度为12  $\mu\text{m}$ 。与NP460细胞相比, NPC43细胞的形状较细长、尺寸较小, 更容易挤进三维支架平台的10  $\mu\text{m}$ 宽沟槽。因此, 当底层采用20/10  $\mu\text{m}$  R/T网格图

案时, NPC43细胞挤进10  $\mu\text{m}$ 宽沟槽的概率比NP460细胞高75%。

### 3.3. NP460细胞和NPC43细胞在双层支架平台上共同培养

上述实验中, NP460细胞与NPC43细胞的分离概率是基于在独立平台上分别接种两种细胞后得到的。接下来, 我们在设计参数优化的底层为20/10  $\mu\text{m}$  R/T网格的双

层支架平台上共同培养NP460细胞和NPC43细胞。实验所用的NP460细胞和NPC43细胞分别转染了不同颜色的荧光蛋白,以使它们能够通过荧光成像进行区分。NP460细胞为绿色荧光蛋白, NPC43细胞为红色荧光蛋白。

同样地,分裂、死亡或与其他细胞接触的细胞不纳入分析。由此,本研究发现,当以每毫升 $1.1 \times 10^5$ 个细胞、悬液体积为2 mL进行研究时,具有最佳的成像与数据分析效果。因此,在共同培养时,两类细胞采用上述相同的密度进行接种。值得注意的是,本实验中细胞总密度(每毫升 $2.2 \times 10^5$ 个细胞)远低于NPC早期时的细胞数量[49]。因此,该平台可用于低NPC43细胞密度下NPC的早期诊断。另外,还可以通过同比增大平台面积来分离高密度细胞。

图7(a)为在底层为 $20/10 \mu\text{m}$ 和 $40/10 \mu\text{m}$  R/T网格的双层平台上共同培养的NP460细胞和NPC43细胞的荧光图像和明场图像。细胞在培养箱中培养6 h后,首先采集荧光实时图像,然后在明场下连续采集细胞延时运动图像,持续时间为15 h。如图7(b)所示, NP460细胞和NPC43细胞挤进双层支架平台(底层为 $20/10 \mu\text{m}$  R/T网格)  $10 \mu\text{m}$ 宽沟槽的概率分别为10%和84%。因此,当NP460细胞和NPC43细胞在该平台上共同培养时,分离概率为74%。可见,更高密度的底层网格设计( $20/10 \mu\text{m}$  R/T)有利于实现更高的细胞分离效率。也即, NPC43细胞在该平台进入狭窄沟槽的概率(84%)高于其在底层为 $40/10 \mu\text{m}$  R/T网格的平台上的概率(73%)。

分离的NPC43细胞可通过底部附近的微流控平台出口进行保存和收集,而NP460细胞可通过顶层另一个出口进行收集。另外,可以采用激光显微切割技术[50]准确切割平台顶部,将平台分成两半。分离后,从平台上半部分

收集NP460细胞,从平台下半部分收集NPC43细胞。

#### 3.4. 鼻咽癌细胞运动性对细胞分离的影响

NPC43细胞本身的运动性可影响其在三维ECM中的运动,因为癌细胞在肿瘤发展过程中往往具有不同的运动性[51–53]。研究表明从成纤维细胞外泌体中获得的ACM可增强某些癌细胞的运动性和转移性[54–55]。在本研究中,我们将ACM添加到NPC43细胞培养基,以研究细胞运动性的变化及其对NPC43细胞与NP460细胞分离效率的影响。

如图8(a)所示,当NPC43细胞培养基与ACM按1:1(体积比)混合时, NPC43细胞在 $40/10 \mu\text{m}$  R/T单层平台上具有更快的迁移速度;这表明ACM可以增强NPC43细胞的运动性。相关研究表明, ACM中所含的外泌体四次跨膜蛋白分子Cd81可以通过Wnt/平面细胞极性信号促进癌细胞的运动性[54]。此外,细胞形状改变会影响细胞进入狭窄沟槽的概率,因此在加入ACM后,对细胞形状随时间的变化(由细胞纵横比显示)也进行了研究。如图8(b)所示,在底层为 $40/10 \mu\text{m}$  R/T网格以及PDMS基剂配比为5:1的单层平台上,利用ACM培养的NPC43细胞纵横比更大,细胞体伸长更多。在双层平台上的实验结果如图8(c)所示, 34%的NPC细胞能够挤进顶层 $10 \mu\text{m}$ 宽沟槽,进而再进入底层网格。可见当加入ACM培养时, NPC43细胞到达底层网格的概率增加了8倍以上。因此,这些结果表明, ACM有效刺激了NPC43细胞,以改变其运动性和形态,从而使NPC43细胞挤进狭窄沟槽,并进入三维平台的底层网格。

在底层为 $20/10 \mu\text{m}$  R/T网格且PDMS基剂配比为5:1的双层支架平台上,加入ACM共同培养NPC43细胞与

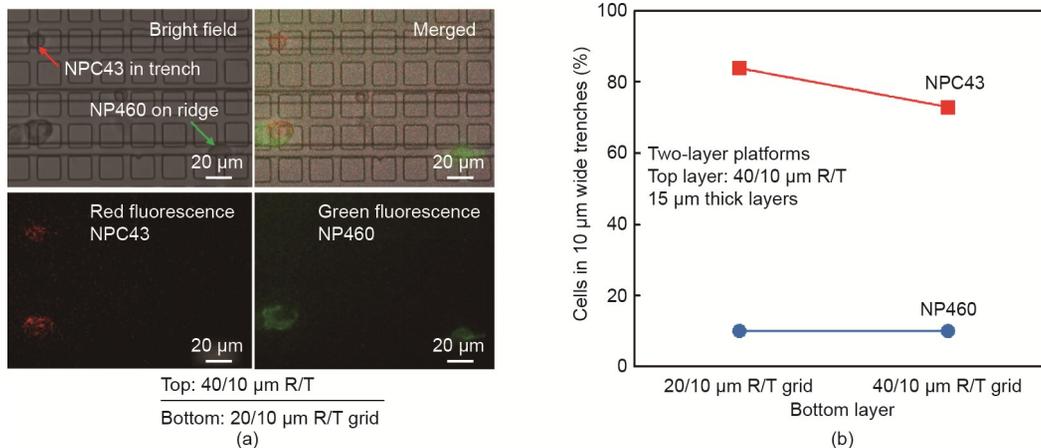


图7. (a)在底层为 $20/10 \mu\text{m}$  R/T网格的双层平台上共同培养的NP460细胞和NPC43细胞的明场图像和荧光显微图像。NP460细胞转染绿色荧光蛋白, NPC43细胞转染红色荧光蛋白。(b)在底层为 $20/10 \mu\text{m}$ 和 $40/10 \mu\text{m}$  R/T网格的双层平台上共同培养的NP460细胞和NPC43细胞的分离概率(误差条在1%以内)。每层厚度为 $15 \mu\text{m}$ , PDMS基剂配比为5:1。

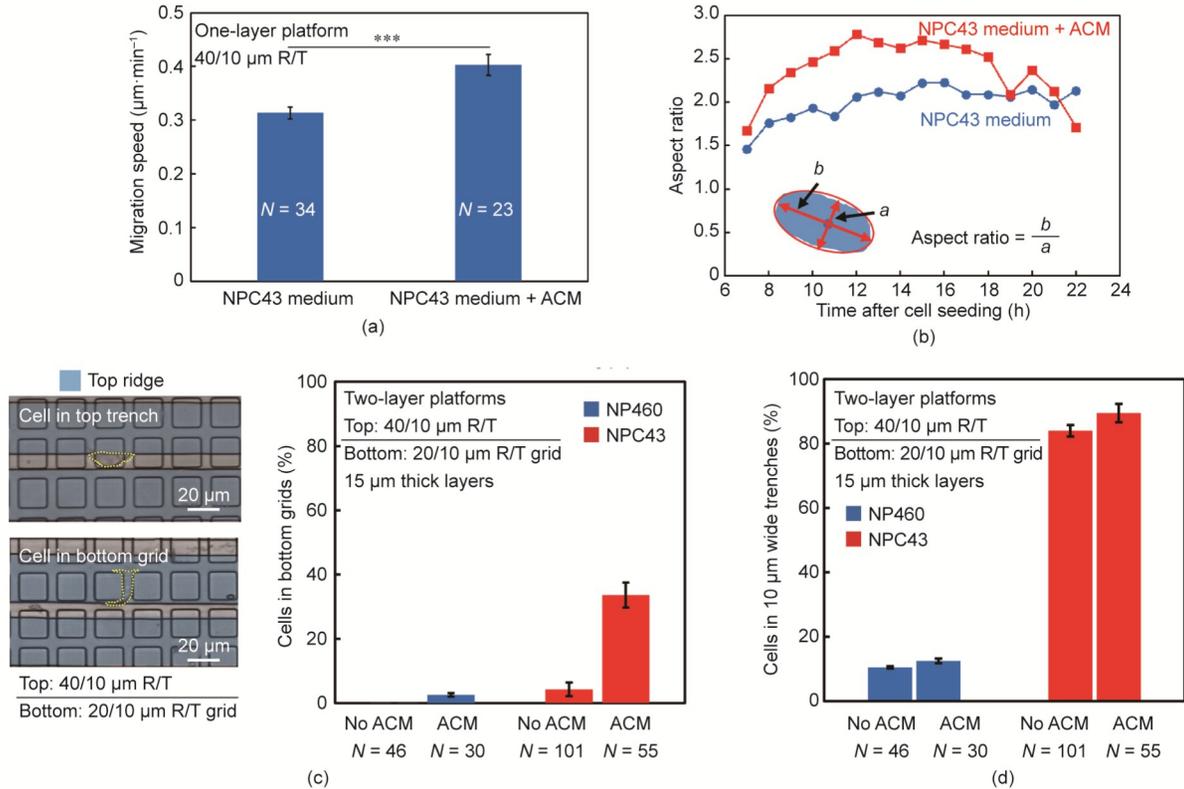


图8. 受ACM刺激的NPC43细胞在10  $\mu\text{m}$ 宽沟槽的单层平台上的迁移速度 (a) 和纵横比 (b) (\*\*\*:  $p < 0.001$ ); (c) 经ACM刺激, NPC43细胞进入双层平台的底层20/10  $\mu\text{m}$  R/T网格的概率; (d) 经ACM刺激, NP460细胞和NPC43细胞迁移进入底层为20/10  $\mu\text{m}$  R/T网格的双层平台沟槽的概率。每层厚度为15  $\mu\text{m}$ , PDMS基剂配比为5:1。

NP460细胞。图8 (d) 中的结果表明, 加入ACM后, NPC43细胞挤进10  $\mu\text{m}$ 宽沟槽的概率增加了5%。ACM的添加加速了NPC43细胞的迁移和伸长, 使细胞更容易通过10  $\mu\text{m}$ 宽的沟槽, 进入底层网格。然而, ACM的存在对NP460细胞挤进顶层沟槽或底层网格的运动影响不大。因此, 在培养基中加入ACM有助于在底层网格中进一步分离NPC43细胞与NP460细胞。对于更活跃的癌细胞, 使用本研究所设计的多层平台可实现更高的细胞分离效率。

#### 4. 结论

正常细胞和癌细胞之间的分离是癌症诊断、治疗和药物研发的关键。由于很难建立稳定的EB病毒阳性细胞株, 关于NPC细胞迁移行为的详细研究此前鲜有报道。本研究根据平台的不同参数特性开发了三维支架平台, 以分离NPC43细胞和NP460细胞。对包括平台刚度、栅格或网格图案布局、层数和网格图案密度等参数均进行优化设计, 以实现最高的细胞分离效率。

采用底层为20/10  $\mu\text{m}$  R/T网格的双层支架平台, 在顶

层10  $\mu\text{m}$ 宽的沟槽中, NPC43细胞与NP460细胞的分离效率为89%。当NPC43细胞通过ACM刺激以增强运动性时, 其与NP460细胞在底层网格中的分离概率可达93%。由于NPC细胞具有高度侵袭性和转移性, 因此将这些细胞从正常细胞中分离出来很重要。图8显示的结果表明, NPC43细胞经ACM刺激具有更高的运动性和变形性, 其分离效率也被提高。基于这一原理, 将其他类型的具有不同运动性和变形性的癌细胞与正常细胞进行分离也是可行的。我们之前的研究[56]表明, 经过适当的形状设计的平台具有筛选各种类型的癌细胞的能力。我们将开展进一步研究, 探讨能够用于分离其他癌细胞株的最佳平台布局 and 特征。

#### 致谢

这项工作得到了香港城市大学生物系统、神经科学和纳米技术中心(CBNN)(9360148和9380062)以及香港大学教育资助委员会(GRF项目:11247716、11218017、11213018和11212519;CRF项目:C1013-15G)的支持。感谢香港大学的S.W. Tsao和C.M. Tsang教授提供了NP460和NPC43

细胞,以及香港城市大学的L. Zhang博士提供了活性条件培养基。

## Compliance with ethics guidelines

W.G. Zhang, Z. Y. Liu, and S. W. Pang declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

## References

- [1] Gossett DR, Weaver WM, Mach AJ, Hur SC, Tse HTK, Lee W, et al. Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems. *Anal Bioanal Chem* 2010; 397(8):3249–67.
- [2] Fiddler M. Fetal cell based prenatal diagnosis: perspectives on the present and future. *J Clin Med* 2014;3(3):972–85.
- [3] Blainey PC, Quake SR. Dissecting genomic diversity, one cell at a time. *Nat Methods* 2014;11(1):19–21.
- [4] Schor SL, Schor AM. Phenotypic and genetic alterations in mammary stroma: implications for tumour progression. *Breast Cancer Res* 2001;3(6):373–9.
- [5] Guo KT, SchÄfer R, Paul A, Gerber A, Ziemer G, Wendel HP. A new technique for the isolation and surface immobilization of mesenchymal stem cells from whole bone marrow using high-specific DNA aptamers. *Stem Cells* 2006;24(10):2220–31.
- [6] Cho SH, Chen CH, Tsai FS, Godin JM, Lo YH. Human mammalian cell sorting using a highly integrated micro-fabricated fluorescence-activated cell sorter (IFACS). *Lab Chip* 2010;10(12):1567–73.
- [7] Pasut A, Oleynik P, Rudnicki MA. Isolation of muscle stem cells by fluorescence activated cell sorting cytometry. *Methods Mol Biol* 2012;798:53–64.
- [8] Schulz KR, Danna EA, Krutzik PO, Nolan GP. Single-cell phospho-protein analysis by flow cytometry. *Curr Protoc Immunol* 2012;96(1):8.17–20.
- [9] Wu M, Singh AK. Single-cell protein analysis. *Curr Opin Biotechnol* 2012;23(1):83–8.
- [10] Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990;11(2):231–8.
- [11] Allan AL, Vantghem SA, Tuck AB, Chambers AF, Chin-Yee IH, Keeney M. Detection and quantification of circulating tumor cells in mouse models of human breast cancer using immunomagnetic enrichment and multiparameter flow cytometry. *Cytometry A* 2005;65(1):4–14.
- [12] Hejazian M, Li W, Nguyen NT. Lab on a chip for continuous-flow magnetic cell separation. *Lab Chip* 2015;15(4):959–70.
- [13] Holt LM, Olsen ML. Novel applications of magnetic cell sorting to analyze cell-type specific gene and protein expression in the central nervous system. *PLoS ONE* 2016;11(2):e0150290.
- [14] Citri A, Pang ZP, Südhof TC, Wernig M, Malenka RC. Comprehensive qPCR profiling of gene expression in single neuronal cells. *Nat Protoc* 2011;7(1):118–27.
- [15] Paiè P, Zandrini T, Vázquez RM, Osellame R, Bragheri F. Particle manipulation by optical forces in microfluidic devices. *Micromachines* 2018;9(5):200.
- [16] Eberwine J, Yeh H, Miyashiro K, Cao Y, Nair S, Finnell R, et al. Analysis of gene expression in single live neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(7):3010–4.
- [17] Yousuff CM, Ho ETW, Hussain KI, Hamid NHB. Microfluidic platform for cell isolation and manipulation based on cell properties. *Micromachines* 2017; 8(1):15.
- [18] Tai CH, Hsiung SK, Chen CY, Tsai ML, Lee GB. Automatic microfluidic platform for cell separation and nucleus collection. *Biomed Microdevices* 2007; 9(4):533–43.
- [19] Yun H, Kim K, Lee WG. Cell manipulation in microfluidics. *Biofabrication* 2013;5(2):022001.
- [20] Shields IV CW, Reyes CD, López GP. Microfluidic cell sorting: a review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation. *Lab Chip* 2015;15(5):1230–49.
- [21] Ji HM, Samper V, Chen Y, Heng CK, Lim TM, Yobas L. Silicon-based microfilters for whole blood cell separation. *Biomed Microdevices* 2008;10(2): 251–7.
- [22] Huang LR, Cox EC, Austin RH, Sturm JC. Continuous particle separation through deterministic lateral displacement. *Science* 2004;304(5673):987–90.
- [23] Kuntaegowdanahalli SS, Bhagat AAS, Kumar G, Papautsky I. Inertial microfluidics for continuous particle separation in spiral microchannels. *Lab Chip* 2009;9(20):2973–80.
- [24] Zheng S, Lin H, Liu JQ, Balic M, Datar R, Cote RJ, et al. Membrane microfilter device for selective capture, electrolysis and genomic analysis of human circulating tumor cells. *J Chromatogr A* 2007;1162(2):154–61.
- [25] Takagi J, Yamada M, Yasuda M, Seki M. Continuous particle separation in a microchannel having asymmetrically arranged multiple branches. *Lab Chip* 2005;5(7):778–84.
- [26] Yamada M, Kano K, Tsuda Y, Kobayashi J, Yamato M, Seki M, et al. Microfluidic devices for size-dependent separation of liver cells. *Biomed Microdevices* 2007;9(5):637–45.
- [27] Kuo JS, Zhao Y, Schiro PG, Ng L, Lim DSW, Shelby JP, et al. Deformability considerations in filtration of biological cells. *Lab Chip* 2010;10(7):837–42.
- [28] Mohamed H, Turner JN, Caggana M. Biochip for separating fetal cells from maternal circulation. *J Chromatogr A* 2007;1162(2):187–92.
- [29] Hsu CH, Di Carlo D, Chen C, Irimia D, Toner M. Microvortex for focusing, guiding and sorting of particles. *Lab Chip* 2008;8(12):2128–34.
- [30] Chen DF, Du H, Li WH. A 3D paired microelectrode array for accumulation and separation of microparticles. *J Micromech Microeng* 2006;16(7):1162.
- [31] Cui HH, Voldman J, He XF, Lim KM. Separation of particles by pulsed dielectrophoresis. *Lab Chip* 2009;9(16):2306–12.
- [32] MacDonald MP, Spalding GC, Dholakia K. Microfluidic sorting in an optical lattice. *Nature* 2003;426(6965):421–4.
- [33] Milne G, Rhodes D, MacDonald M, Dholakia K. Fractionation of polydisperse colloid with acousto-optically generated potential energy landscapes. *Opt Lett* 2007;32(9):1144–6.
- [34] McFaul SM, Lin BK, Ma H. Cell separation based on size and deformability using microfluidic funnel ratchets. *Lab Chip* 2012;12(13):2369–76.
- [35] Preira P, Grandné V, Forel JM, Gabriele S, Camara M, Theodoly O. Passive circulating cell sorting by deformability using a microfluidic gradual filter. *Lab Chip* 2013;13(1):161–70.
- [36] Lu X, Martin A, Soto F, Angsantikul P, Li J, Chen C, et al. Parallel label-free isolation of cancer cells using arrays of acoustic microstreaming traps. *Adv Mater Technol* 2019;4(2):1800374.
- [37] Tang QY, Tong WY, Shi J, Shi P, Lam YW, Pang SW. Influence of engineered surface on cell directionality and motility. *Biofabrication* 2014;6(1):015011.
- [38] Zhou SF, Gopalakrishnan S, Xu YH, Yang J, Lam YW, Pang SW. A unidirectional cell switching gate by engineering grating length and bending angle. *PLoS ONE* 2016;11(1):e0147801.
- [39] Wei WI, Sham JST. Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet* 2005;365(9476):2041–54.
- [40] Chan KCA, Hung ECW, Woo JKS, Chan PKS, Leung SF, Lai FPT, et al. Early detection of nasopharyngeal carcinoma by plasma Epstein–Barr virus DNA analysis in a surveillance program. *Cancer* 2013;119(10):1838–44.
- [41] Siva Sankar P, Mat MFC, Muniandy K, Xiang BLS, Ling PS, Hoe SLL, et al. Modeling nasopharyngeal carcinoma in three dimensions. *Oncol Lett* 2017;13(4):2034–44.
- [42] Yip YL, Lin W, Deng W, Jia L, Lo KW, Busson P, et al. Establishment of a nasopharyngeal carcinoma cell line capable of undergoing lytic Epstein–Barr virus reactivation. *Lab Invest* 2018;98(8):1093–104.
- [43] Dittmer DP, Hilscher CJ, Gulley ML, Yang EV, Chen M, Glaser R. Multiple pathways for Epstein–Barr virus episome loss from nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 2008;123(9):2105–12.
- [44] Lin W, Yip YL, Jia L, Deng W, Zheng H, Dai W, et al. Establishment and characterization of new tumor xenografts and cancer cell lines from EBV-positive nasopharyngeal carcinoma. *Nat Commun* 2018;9(1):4663.
- [45] Wang Y, Wang G, Luo X, Qiu J, Tang C. Substrate stiffness regulates the proliferation, migration, and differentiation of epidermal cells. *Burns* 2012;38(3):414–20.
- [46] Bangasser BL, Shamsan GA, Chan CE, Opoku KN, Tüzel E, Schlichtmann BW, et al. Shifting the optimal stiffness for cell migration. *Nat Commun* 2017;8(1):15313.
- [47] Pathak A, Kumar S. Independent regulation of tumor cell migration by matrix stiffness and confinement. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109(26):10334–9.
- [48] Zhong Y, Ji B. Impact of cell shape on cell migration behavior on elastic substrate. *Biofabrication* 2013;5(1):015011.

- [49] Huang L, Chua MLK. Surgery as an alternative to radiotherapy in early-stage nasopharyngeal carcinoma: innovation at the expense of uncertainty. *Cancer Commun* 2020;40(2–3):119–21.
- [50] Zhao L, Lu YT, Li F, Wu K, Hou S, Yu J, et al. High-purity prostate circulating tumor cell isolation by a polymer nanofiber-embedded microchip for whole exome sequencing. *Adv Mater* 2013;25(21):2897–902.
- [51] van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res* 2011;728(1–2):23–34.
- [52] Bange J, Prechtel D, Cheburkin Y, Specht K, Harbeck N, Schmitt M, et al. Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg388 allele. *Cancer Res* 2002;62(3):840–7.
- [53] Olson MF, Sahai E. The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis* 2009;26(4):273–87.
- [54] Luga V, Zhang L, Vitoria-Petit AM, Ogunjimi AA, Inanlou MR, Chiu E, et al. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt–PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell* 2012;151(7):1542–56.
- [55] Zhang L, Luga V, Armitage SK, Musiol M, Won A, Yip CM, et al. A lateral signalling pathway coordinates shape volatility during cell migration. *Nat Commun* 2016;7(1):11714.
- [56] Zhou SF, Gopalakrishnan S, Xu YH, To SKY, Wong AST, Pang SW, et al. Substrates with patterned topography reveal metastasis of human cancer cells. *Biomed Mater* 2017;12(5):055001.