



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109682586 A

(43)申请公布日 2019. 04. 26

(21)申请号 201910032581.X

(22)申请日 2019.01.14

(71)申请人 重庆大学

地址 400044 重庆市沙坪坝区沙正街174号

(72)发明人 徐紫宸 王贵学

(74)专利代理机构 北京元本知识产权代理事务所 11308

代理人 黎昌莉

(51)Int.Cl.

G01M 13/00(2019.01)

B01L 3/00(2006.01)

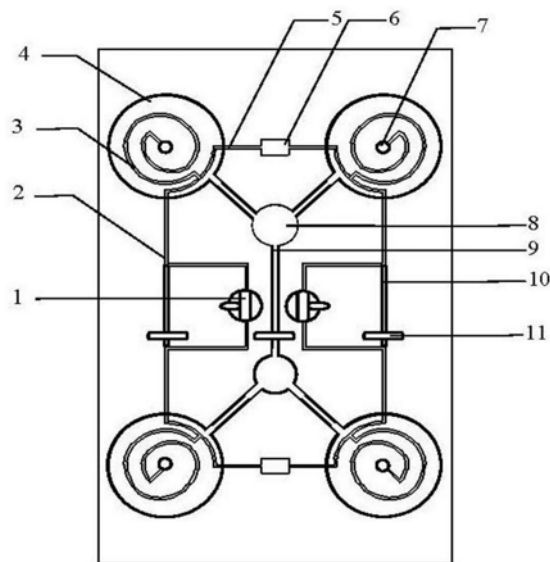
权利要求书1页 说明书6页 附图4页

(54)发明名称

一种基于微流控芯片进行体外血管支架评测实验的方法和应用

(57)摘要

本发明属于微流控芯片技术领域,具体涉及一种基于微流控芯片进行体外血管支架评测实验的方法和应用。所述方法包括以下步骤:设置包括加样阀1、循环脉动微泵6和细胞培养池4的微流控芯片体外血管支架评测系统,使用所述微流控芯片体外血管支架评测系统再通过取样塞头13进行取样,并收集实验数据,评价实验结果。所述方法减少了评测实验需求的时间成本和原料成本的消耗,确保多条件下实验的同一性,确保实验结果的可比性。



1. 一种基于微流控芯片进行体外血管支架评测实验的方法,包括以下步骤:

1) 设置包括加样阀1、循环脉动微泵6和细胞培养池4的微流控芯片体外血管支架评测系统;

2) 关闭所有截止阀11和加样阀1,将血管支架12套在配套的支架实验管7上,从样品口8加入培养基流入细胞培养池4,将活细胞悬浮液接种在血管支架12上,待细胞贴壁后,打开截止阀11;

3) 通过取样塞头13进行取样,并收集实验数据,评价实验结果。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,细胞作为变量评测时,步骤2)为关闭所有截止阀11和加样阀1,将相同血管支架12套在配套的支架实验管7上,从样品口8加入相同培养基流入细胞培养池4,将不同的活细胞悬浮液接种在血管支架12上,待细胞贴壁后,打开截止阀11,两个样品口8中间的截止阀需要保持关闭,调整循环脉动微泵6,即可开始评测实验。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,培养环境作为变量评测时,步骤2)为关闭所有截止阀11和加样阀1,将相同血管支架12套在配套的支架实验管7上,从样品口8加入相同培养基流入细胞培养池4,将相同的活细胞悬浮液接种在血管支架12上,待细胞贴壁后,打开截止阀11,两个样品口8中间的截止阀需要保持关闭,打开加样阀1,加入不同的添加剂,调整循环脉动微泵6,即可开始评测实验。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,血管支架12作为变量评测时,步骤2)为关闭所有截止阀11和加样阀1,将不同的血管支架12套在配套的支架实验管7上,从样品口8加入相同培养基流入细胞培养池4,将相同的活细胞悬浮液接种在血管支架12上,待细胞贴壁后,打开截止阀11,两个样品口8中间的截止阀保持开启,调整循环脉动微泵6,即可开始评测实验。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述取样塞头13能够穿入取样针头取样,所述取样塞头13内部装有压力传感探头能够将支架实验管7内的液体压力输出到显示器显示。

6. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述培养基为非离子试剂和细胞培养液的混合试剂。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述芯片的盘状通道3采用离子交换膜封闭,隔离盘状通道3内的离子溶液和细胞培养池4的溶液。

8. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述芯片是一个封闭的循环系统,芯片内的液体可回流。

9. 根据权利要求1-8所述的方法,其特征在于,所述的评测实验的温度为 $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。

10. 权利要求1-8所述的方法在血管支架体外评测中的应用。

一种基于微流控芯片进行体外血管支架评测实验的方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于微流控芯片技术领域,具体涉及一种基于微流控芯片进行体外血管支架评测实验的方法和应用。

背景技术

[0002] 心血管疾病患病率年年攀升,根据我国人口老龄化形势和人口增长率的情况,预计我国心血管疾病的患病率会在2030年增至50%,其严重性与普遍性不容忽视。而目前治疗心血管疾病最重要的一个治疗方式就是介入治疗法,其中血管支架的植入又是介入治疗中最常用的手段。研发新的更适用于人体复杂内环境的血管支架对缓解日益严峻的心血管疾病发病率有着重大意义。

[0003] 对于血管支架的相关研究来说,评测支架在植入血管后与血流及血管组织之间的互作效应是非常关键的一环,这关系到支架植入后临床不良事件的发生率以及术后晚期心血管疾病的复发率,保证支架能如预期发挥治疗作用并且不会产生其他致命的后期副作用。除此之外,研究其中的力-生物学机制也是探明心血管疾病发生及发展的重要推力,可以通过相关机制对支架本身或支架涂层进行特异性修饰改造,构建优化介入方案。

[0004] 目前,有关的评测研究实验通常局限在动物模型测试中。而动物实验限制因素颇多,诸如对动物生理状态和介入手术条件的把控、实验动物的饲养和动物模型构建费用等,还有准备周期长、准备程序繁复等缺点。然而支架的评测实验又是必不可少的。

[0005] 因此,为了能够使研究者能够快速便利的完成血管支架的评测实验,也为了能加快血管支架的研究进程,解决闭合性冠状动脉疾病的治疗问题,利用微流控技术,构建出一种能够在体外进行相关评测实验的方法是十分必要的。

发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明的目的之一在于提供一种基于微流控芯片进行体外血管支架评测实验的方法,该方法可以方便有效的对血管支架进行评测,克服了实验动物的饲养和动物模型构建费用等,还有准备周期长、准备程序繁复等缺点。

[0007] 为实现上述目的,本发明采用以下方案:

[0008] 一种基于微流控芯片进行体外血管支架评测实验的方法,包括以下步骤:

[0009] 1) 设置包括加样阀1、循环脉动微泵6和细胞培养池4的微流控芯片体外血管支架评测系统;

[0010] 2) 关闭所有截止阀11和加样阀1,将血管支架12套在配套的支架实验管7上,从样品口8加入培养基流入细胞培养池4,将活细胞悬浮液接种在血管支架12上,待细胞贴壁后,打开截止阀11;

[0011] 3) 通过取样塞头13进行取样,并收集实验数据,评价实验结果。

[0012] 所使用芯片主要由加样阀1、循环脉动微泵6、细胞培养池4组成;所述芯片呈圆形

或矩形,在其中心位置加工有2个并排的圆柱形加样阀1;每个圆柱形加样阀1在同一截面直径线上加工有相对的2个开口,每个开口分别连接1条进样管2;所述每个进样管2各自通往各自的一个细胞培养池4,共4个细胞培养池4,与细胞培养池4内底部加工的盘状通道3相通;

[0013] 所述4个细胞培养池4均匀分布在矩形芯片的四个角处,或圆形芯片对称的四个边处;在一对细胞培养池4之间加工安装有1个循环脉动微泵6,循环脉动微泵6串通在2条循环管5中间,2条循环管5分别与循环脉动微泵6两旁的细胞培养池4内的盘状通道3相连通;所述循环管5和进样管2是在细胞培养池4边的T型接口17处与盘状通道3共同连通的;盘状通道3中间有管道隔墙19,从T型接口17将盘状通道3分成2个盘状双小管18;盘状通道3沿细胞培养池4底面盘旋到细胞培养池4的中心处,与加工固定在中心处的支架实验管7相通;所述支架实验管7是一弹性材质的、高出细胞培养池4的空心管,其顶端开口处安装有取样塞头13;取样塞头13内部装有压力传感探头。

[0014] 所述芯片中部在2个并排的圆形加样阀1之间加工有2个样品口8,2个样品口8之间加工有样品通道9相互连通,连通的样品通道9上加工有截止阀11;所述2个样品口8还各自加工有2条样品通道9分别与2个细胞培养池4连通。

[0015] 所述进样管2在2个加样阀1旁边各自加工有1条单向循环管10,连通加样阀1两头的进样管2;每条单向循环管10上都加工有截止阀11。

[0016] 所述芯片的所有进样管2、盘状通道3、循环管5、样品通道9、单向循环管10、支架实验管7都是密封管道;所述盘状通道3用离子交换膜封闭,保证盘状通道3内的离子溶液与细胞培养池4的溶液不能够相混合;所述加样阀1的圆柱形内部是阀体16,阀体16内部加工有一条上部开口,端头尺寸与进样管2配合的阀内通道14;阀体16顶端加工有阀钮15。

[0017] 进一步,细胞作为变量评测时,步骤2)为关闭所有截止阀11和加样阀1,将相同血管支架12套在配套的支架实验管7上,从样品口8加入相同培养基流入细胞培养池4,将不同的活细胞悬浮液接种在血管支架12上,待细胞贴壁后,打开截止阀11,两个样品口8中间的截止阀需要保持关闭,调整循环脉动微泵6,即可开始评测实验。

[0018] 截止阀的作用主要是隔离两种不同的培养环境。

[0019] 更进一步,所述培养基为非离子试剂和细胞培养液的混合试剂。

[0020] 非离子试剂与细胞培养液混合通常需要搅拌以达到均匀的状态,在这个装置中,可通过循环脉动微泵6的作用达到搅拌混匀的目的。

[0021] 进一步,培养环境作为变量评测时,步骤2)为关闭所有截止阀11和加样阀1,将相同血管支架12套在配套的支架实验管7上,从样品口8加入相同培养基流入细胞培养池4,将相同的活细胞悬浮液接种在血管支架12上,待细胞贴壁后,打开截止阀11,两个样品口8中间的截止阀需要保持关闭,打开加样阀1,加入不同的添加剂,调整循环脉动微泵6,即可开始评测实验。

[0022] 进一步,血管支架12作为变量评测时,步骤2)为关闭所有截止阀11和加样阀1,将不同的血管支架12套在配套的支架实验管7上,从样品口8加入相同培养基流入细胞培养池4,将相同的活细胞悬浮液接种在血管支架12上,待细胞贴壁后,打开截止阀11,两个样品口8中间的截止阀保持开启,调整循环脉动微泵6,即可开始评测实验。

[0023] 所述支架实验管7的直径尺寸有不同规格,不同管径的血管支架12能够贴合套上。

[0024] 进一步,所述取样塞头13能够穿入取样针头取样,取样塞头13内部装有压力传感探头能够将支架实验管7内的液体压力输出到显示器显示。

[0025] 进一步,所述芯片的盘状通道3采用离子交换膜封闭,隔离盘状通道3内的离子溶液和细胞培养池4的溶液。

[0026] 离子交换膜本身有离子基团,可以对溶液里的离子进行选择透过,对装置内的液体能进行可控的处理和调整。

[0027] 进一步,所述芯片是一个封闭的循环系统,芯片内的液体可回流。

[0028] 进一步,所述的评测实验的温度为 $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$,选为 37°C 。

[0029] 实验最后由实验前后支架降解或变形程度、支架表面细胞的粘附和生长程度、培养液中成分的变化来收集实验数据,评价实验结果。

[0030] 本发明的目的之二在于提供一种所述体外血管支架评测实验的方法的应用,具体为在血管支架体外评测中的应用。

[0031] 本发明提供的基于微流控芯片进行体外血管支架评测实验的方法是循环系统与细胞培养的结合,适用于血管支架的评测实验工作、科研工作。

[0032] 在某些实施例中,进行体外血管支架评测实验遵循控制唯一变量的实验思想进行设计。

[0033] 当细胞作为变量评测时:在研究血管及血管支架相关问题时,常用的研究细胞类别。包括但不限于:人脐静脉内皮细胞(HUVEC)、人脐动脉平滑肌细胞(HUASMC)、大鼠胸大动脉平滑肌细胞(A7r5)。

[0034] 当培养环境作为变量评测时:培养基不同如RPMI-1640培养基、DMEM培养基(包含高糖、中糖及低糖配方);芯片可以通过阀门的控制实现隔室分离,在种植细胞相同、加装支架的规格相同的前提下,在不同隔室中添加额外的细胞作用因子,如炎症因子和细胞生长因子等。理论上说,只要可以溶于培养基,或者可以均匀分散于培养基中的,可以对细胞产生一定作用的物质都可以作为构建不同培养环境的工具。

[0035] 当血管支架作为变量评测时:支架的不同不仅可以体现在其规格不同上,也可以体现在材料本身、表面图形、表面涂层上。即使是相同规格的支架,支架表面所搭载的涂层成分或者搭载涂层的方式不同,也可作为唯一的变量进行对比试验。

[0036] 本发明的有益效果在于:

[0037] 1) 本发明的基于微流控芯片进行体外血管支架评测实验的方法克服了实验动物的饲养和动物模型构建费用等,还有准备周期长、准备程序繁复等缺点,减少了评测实验需求的时间成本和原料成本的消耗;

[0038] 2) 本发明的基于微流控芯片进行体外血管支架评测实验的方法可确保多条件下实验的同一性,确保实验结果的可比性;

[0039] 3) 本发明的基于微流控芯片进行体外血管支架评测实验的方法采用的离子交换膜,在保证在细胞培养区阳离子浓度的不变的同时有效的屏蔽了其他离子的干扰,实现了在实验过程中的严密性,使得实验反应与结果检测一体化,方便快捷。

附图说明

[0040] 图1为矩形芯片的主视结构示意图。

- [0041] 图2为圆形芯片的主视结构示意图。
- [0042] 图3为一个细胞培养池的局部剖视示意图。
- [0043] 图4为一种加样阀开通状态下的主视结构示意图。
- [0044] 图5为一种加样阀开通状态下的俯视结构示意图。
- [0045] 图6为一种加样阀关闭状态下的主视结构示意图。
- [0046] 图7为一种加样阀关闭状态下的俯视结构示意图。
- [0047] 图8为一种细胞培养池的T型接口的局部示意图。
- [0048] 图9为不同涂层表面的SEM扫描图像。
- [0049] 图10为各组涂层支架表面平滑肌细胞增殖实验结果。
- [0050] 图中:1.加样阀;2.进样管;3.盘状通道;4.细胞培养池;5.循环管;6.循环脉动微泵;7.支架实验管;8.样品口;9.样品通道;10.单向循环管;11.截止阀;12.血管支架;13.取样塞头;14.阀内通道;15.阀钮;16.阀体;17.T型接口;18.盘状双小管;19.管道隔墙。

具体实施方式

[0051] 所举实施例是为了更好地对本发明进行说明,但并不是本发明的内容仅局限于所举实施例。所以熟悉本领域的技术人员根据上述发明内容对实施方案进行非本质的改进和调整,仍属于本发明的保护范围。

[0052] 实施例1不同细胞作用下基于微流控芯片进行体外血管支架评测实验的方法

[0053] 采用图1所示的矩形血管支架实验用微流控芯片,芯片主要由加样阀1、循环脉动微泵6、细胞培养池4等组成。所述芯片呈圆形或矩形,在其中心位置加工有2个并排的圆柱形加样阀1;每个圆柱形加样阀1在同一截面直径线上加工有相对的2个开口,每个开口分别连接1条进样管2;所述每个进样管2各自通往各自的一个细胞培养池4,共4个细胞培养池4,与细胞培养池4内底部加工的盘状通道3相通。

[0054] 所述4个细胞培养池4均匀分布在矩形芯片的四个角处,或圆形芯片对称的四个边处;在一对细胞培养池4之间加工安装有1个循环脉动微泵6,循环脉动微泵6串通在2条循环管5中间,2条循环管5分别与循环脉动微泵6两旁的细胞培养池4内的盘状通道3相连通;所述循环管5和进样管2是在细胞培养池4边的T型接口17处与盘状通道3共同连通的;盘状通道3中间有管道隔墙19,从T型接口17将盘状通道3分成2个盘状双小管18;盘状通道3沿细胞培养池4底面盘旋到细胞培养池4的中心处,与加工固定在中心处的支架实验管7相通;所述支架实验管7是一弹性材质的、高出细胞培养池4的空心管,其顶端开口处安装有取样塞头13;取样塞头13内部装有压力传感探头。

[0055] 所述芯片中部在2个并排的圆形加样阀1之间加工有2个样品口8,2个样品口8之间加工有样品通道9相互连通,连通的样品通道9上加工有截止阀11;所述2个样品口8还各自加工有2条样品通道9分别与2个细胞培养池4连通。

[0056] 所述进样管2在2个加样阀1旁边各自加工有1条单向循环管10,连通加样阀1两头的进样管2;每条单向循环管10上都加工有截止阀11。

[0057] 所述芯片的所有进样管2、盘状通道3、循环管5、样品通道9、单向循环管10、支架实验管7都是密封管道;所述盘状通道3用离子交换膜封闭,保证盘状通道3内的离子溶液与细胞培养池4的溶液不能够相混合;所述加样阀1的圆柱形内部是阀体16,阀体16内部加工有

一条上部开口,端头尺寸与进样管2配合的阀内通道14;阀体16顶端加工有阀钮15。

[0058] 关闭所有截止阀11和加样阀1。将相同的血管支架12套在配套的支架实验管7上。从样品口8加入相同的培养基流入细胞培养池4。将不同的活细胞(如人脐静脉内皮细胞、人脐动脉平滑肌细胞和大鼠胸大动脉平滑肌细胞)悬浮液接种在血管支架12上,待细胞贴壁后,打开截止阀11,其中两个样品口8中间的截止阀需要保持关闭,调整循环脉动微泵6,即可开始相关实验。在实验过程中,加样阀1处于关闭状态,根据细胞培养池4中细胞的状态,通过样品口8添加细胞培养基(或者先加非离子试剂,再加细胞培养液),可通过取样塞头13进行取样分析,由实验前后支架降解或变形程度、支架表面细胞的粘附和生长程度、培养液中成分的变化来收集实验数据,评价实验结果。

[0059] 实施例2不同培养环境作用下基于微流控芯片进行体外血管支架评测实验的方法

[0060] 采用图2所示的圆形血管支架实验用微流控芯片,芯片结构与实施例1使用的矩形芯片结构一致。关闭所有截止阀11和加样阀1。将相同的血管支架12套在配套的支架实验管7上。从样品口8加入相同的培养基流入细胞培养池4。将相同的活细胞悬浮液接种在血管支架12上。待细胞贴壁后,打开截止阀11,其中两个样品口8中间的截止阀需要保持关闭,打开加样阀1,加入不同的实验试剂(如炎症因子和细胞生长因子),调整循环脉动微泵6,即可开始相关实验。在实验过程中,加样阀1处于关闭状态。根据细胞培养池4中细胞的状态,通过样品口8添加细胞培养基。可通过取样塞头13进行取样分析,由实验前后支架降解或变形程度、支架表面细胞的粘附和生长程度、培养液中成分的变化来收集实验数据,评价实验结果。

[0061] 实施例3基于微流控芯片进行体外不同血管支架评测实验的方法

[0062] 采用实施例1所述的矩形血管支架实验用微流控芯片,关闭所有截止阀11和加样阀1。将不同的血管支架12套在与之相配的支架实验管7上。从样品口8加入相同的培养基流入细胞培养池4。将相同的活细胞悬浮液接种在血管支架12上,待细胞贴壁后,打开截止阀11,两个样品口8中间的截止阀保持开启,调整循环脉动微泵6,即可开始相关实验。在实验过程中,加样阀1处于关闭状态,根据细胞培养池4中细胞的状态,通过样品口8添加细胞培养基。可通过取样塞头13进行取样分析,由实验前后支架降解或变形程度、支架表面细胞的粘附和生长程度、培养液中成分的变化来收集实验数据,评价实验结果。

[0063] 实施例4血小板粘附实验

[0064] 采用实施例1所述的矩形血管支架实验用微流控芯片,关闭所有截止阀11和加样阀1。将表面加工有不同涂层成分(涂层成分可以是多巴胺、PEI和药物)的血管支架12,套在与之相配的支架实验管7上。从样品口8加入相同的培养基流入细胞培养池4。在装置中添加同等浓度的富血小板血浆,使其能匀速流过支架表面。实验温度37℃,实验时间1h,将相同的活细胞悬浮液接种在血管支架12上,待细胞贴壁后,打开截止阀11,调整循环脉动微泵6,即可开始相关实验。后续实验结果的评测利用扫描电子显微镜(SEM)进行。此次检测每个浓度样本皆随机选择了六个放大倍数为3000的视野,如图9所示,A为2mg/ml多巴胺+5mg/ml PEI组;B为2mg/ml多巴胺+10mg/ml PEI组;C为2mg/ml多巴胺+15mg/ml PEI组;D为空白对照组,即没有涂层的316L不锈钢支架组,1表示未载药组,2为载药组。

[0065] 根据血小板形态和视野框中血小板的数量分析可知,在混合成膜的制作方法中,载药组合和未载药组相比,视野框中血小板的数量较少,更重要的是所粘附的血小板形态

没有发生过多的改变,没有伪足伸出。在三个载药组当中,B-2组即2mg/ml多巴胺+10mg/ml PEI载药组合粘附数量最少,粘附的血小板形态大多呈圆形正常状态,激活程度低,在血小板粘附试验中效果相对较好。

[0066] 实施例5血管平滑肌细胞增殖实验

[0067] 1.将4组不同实验种类的支架(316LSS组、5mg/ml PEI+DA+GO+DTX coating组、10mg/ml PEI+DA+GO+DTX coating组和15mg/ml PEI+DA+GO+DTX coating组)在超净工作台紫外正反面照射灭菌12h;

[0068] 2.在孔板中放入灭菌后的支架,加入平滑肌细胞悬液,让细胞在支架表面粘附;

[0069] 3.芯片灭菌,取上述支架置于芯片中,加入细胞培养基,再置于37℃、5%CO₂培养箱中培养;

[0070] 4.将芯片在指定时间取出(1d、3d、5d),取出支架放入新的孔板中,每孔加入500μL培养基和50μLMTS检测液,再重新放回37℃细胞培养箱中湿孵2h;

[0071] 5.取出孔板,摇匀反应液并吸取100μL加入96孔板中,置于酶标仪490nm波长处,测吸光度OD值。

[0072] 如图10所示,三组载药支架与316LSS裸片材支架的OD值之间在第1、3、5d皆存在显著性差异($p < 0.05$),其中在第5d,三组载药支架与316LSS裸片材支架之间存在极显著性差异($p < 0.01$)。载药支架的OD值远远低于不载药支架和裸片材支架,说明该组涂层DTX(药物)搭载成功,并对平滑肌细胞的增殖表现出显著的抑制作用。

[0073] 最后说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的宗旨和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

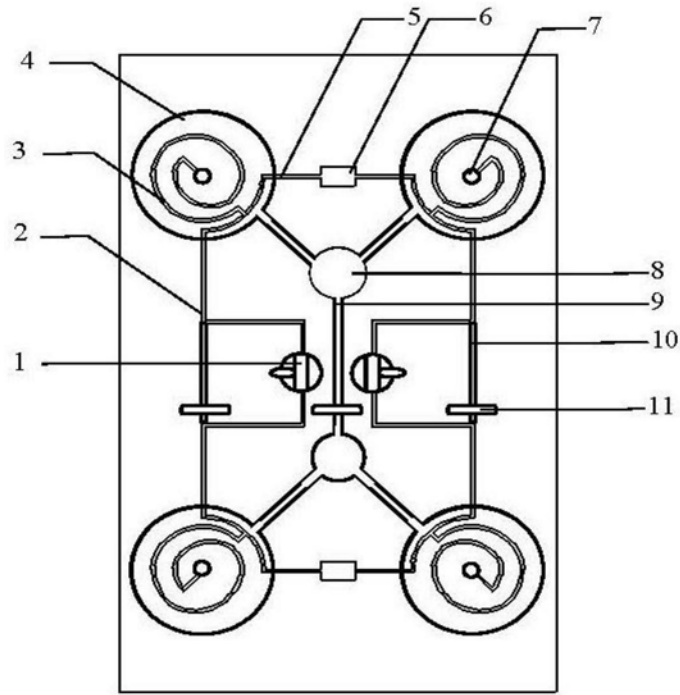


图1

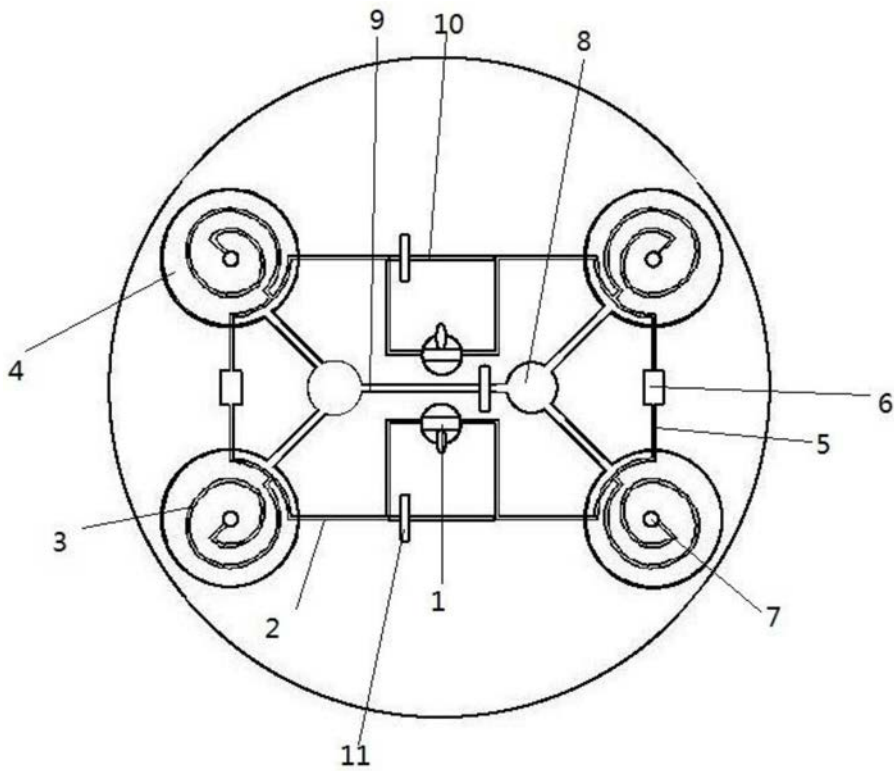


图2

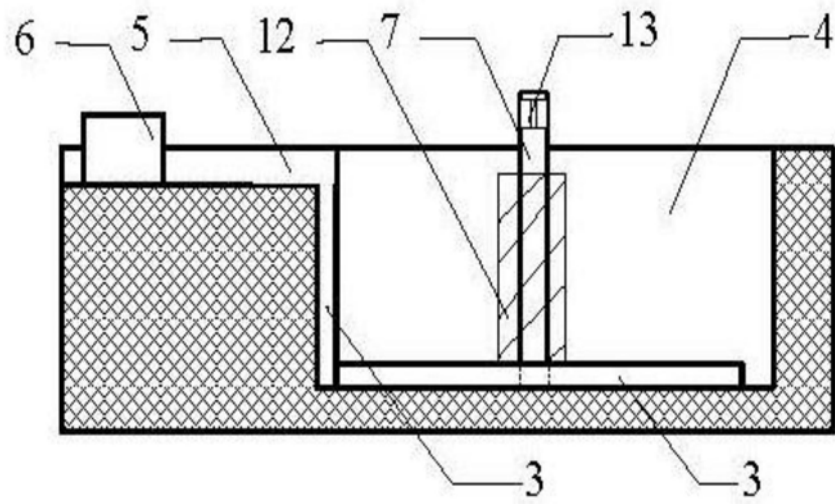


图3

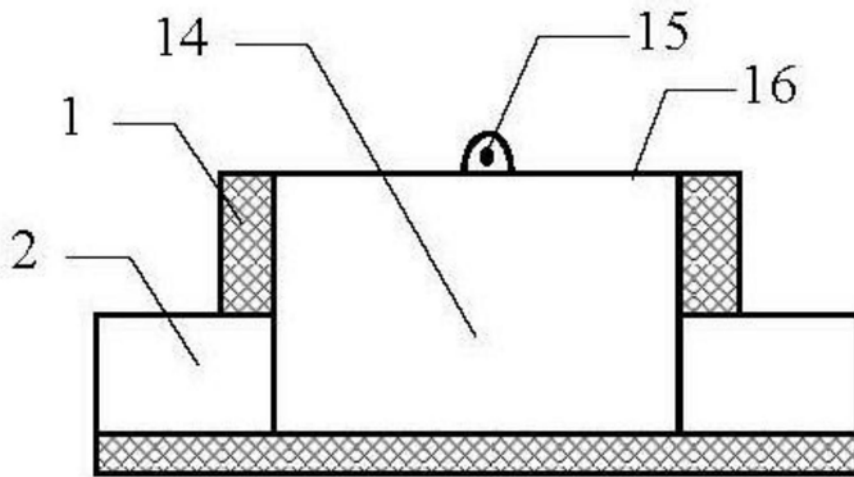


图4

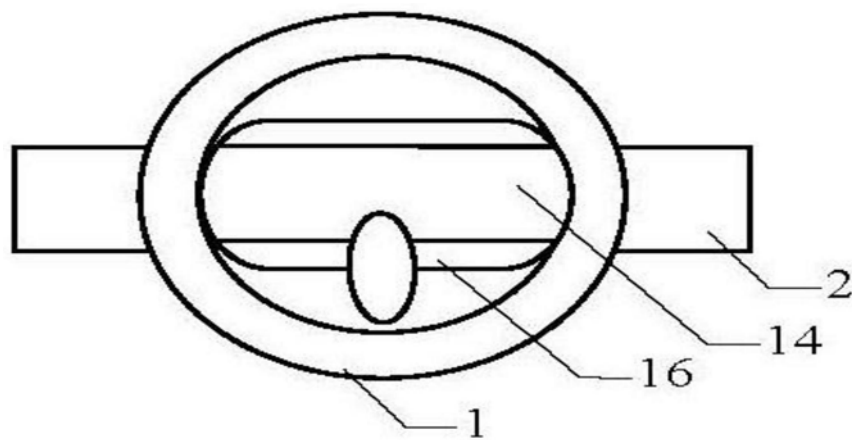


图5

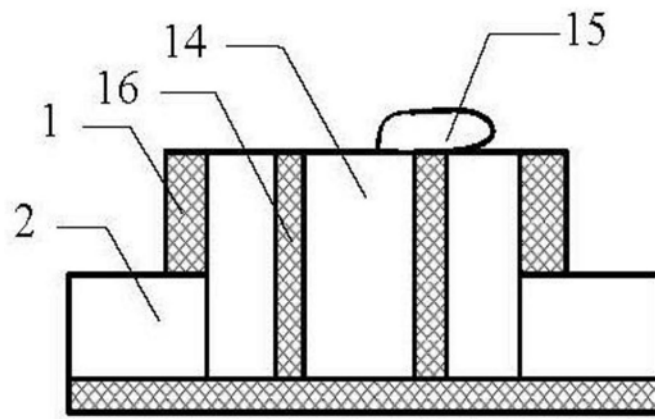


图6

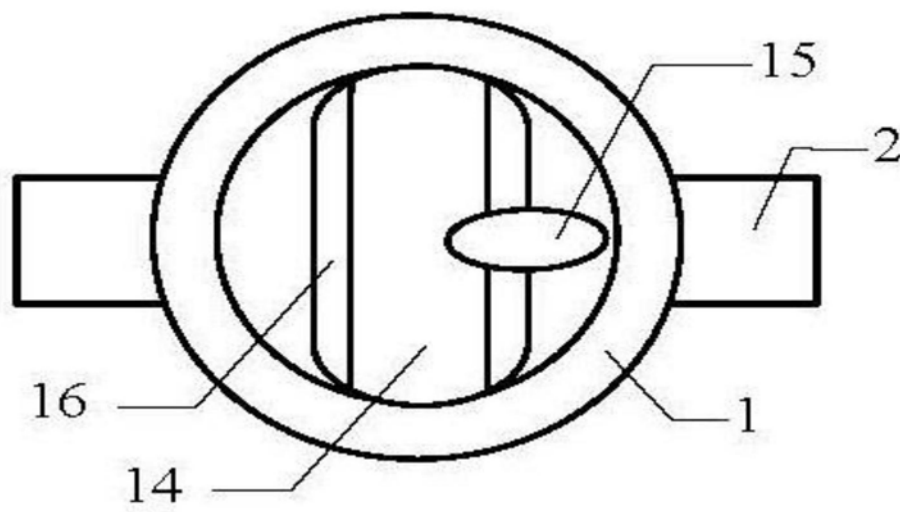


图7

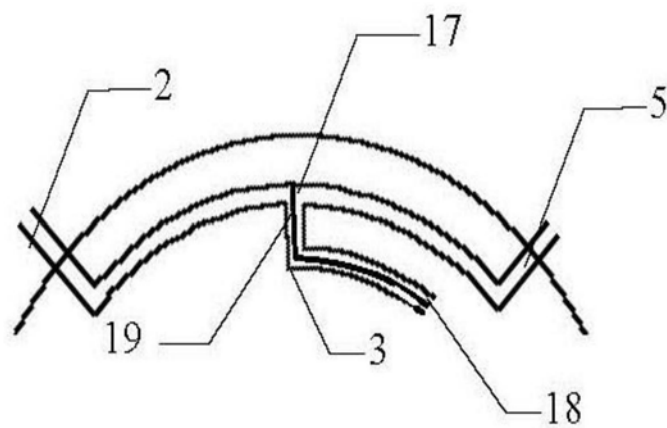


图8

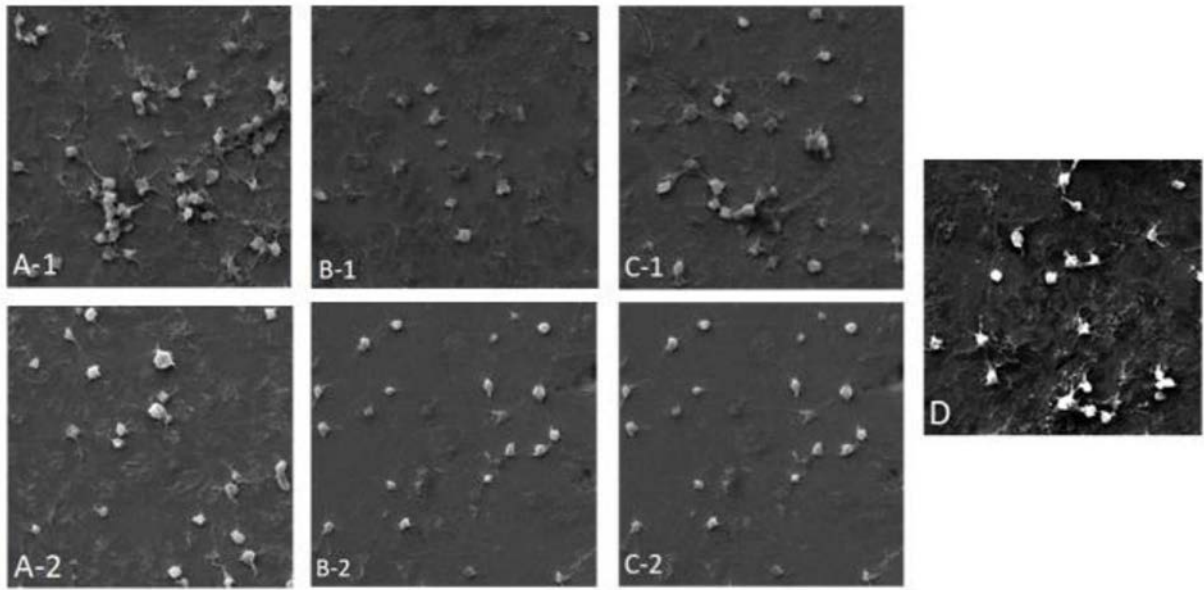


图9

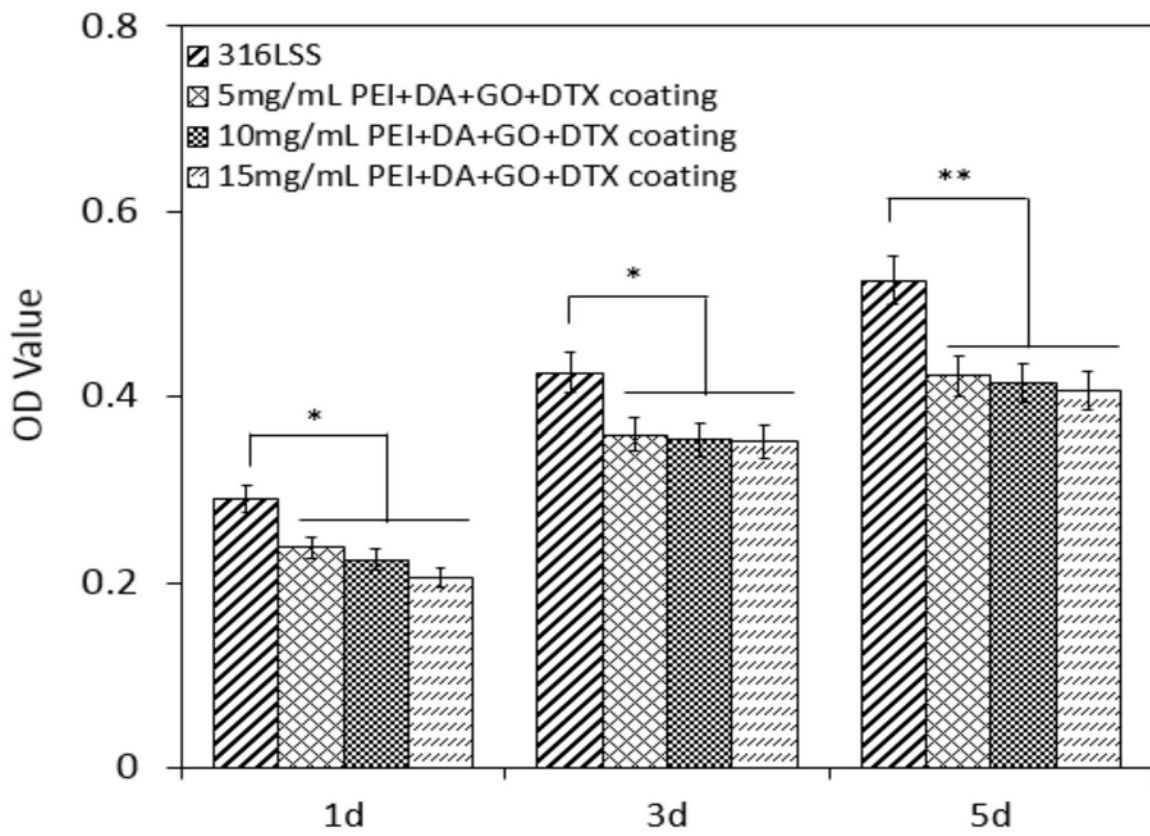


图10