



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104342369 B

(45)授权公告日 2017.08.25

(21)申请号 201310317246.7

C12Q 1/02(2006.01)

(22)申请日 2013.07.25

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104342369 A

US 2009035793 A1,2009.02.05,
CN 101245311 A,2008.08.20,
CN 101008006 A,2007.08.01,
US 2009035793 A1,2009.02.05,

(43)申请公布日 2015.02.11

(73)专利权人 国家纳米科学中心
地址 100190 北京市海淀区中关村北一条
11号

审查员 陈云华

(72)发明人 蒋兴宇 黄卓 刘文文 孙一
郑文富

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332

代理人 巩克栋

(51)Int.Cl.

C12M 3/00(2006.01)

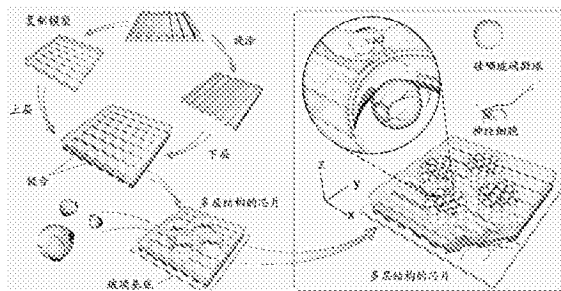
权利要求书2页 说明书8页 附图4页

(54)发明名称

一种采用微流控芯片构建三维神经网络的装置及其制备和使用方法

(57)摘要

本发明公开了一种采用微流控芯片构建三维神经网络的装置及其制备和使用方法。所述装置包括微流控芯片、用于黏附神经细胞的微球和基底，其中所述微流控芯片包括一层或多层PDMS弹性层并具有通孔，所述PDMS弹性层具有供神经细胞突起延伸的微流管道，所述通孔与基底形成用于容纳微球的小室。本发明的装置制备简单，使用其形成的神经网络具有多级结构、高度有序且相互连通的特征，较现有方法更接近体内真实情况，且细胞观察方便。



1. 一种体外培养三维神经网络的装置,其特征在于,所述装置包括微流控芯片、用于黏附神经细胞的微球和基底,其中所述微流控芯片包括多层聚二甲基硅氧烷弹性层并具有通孔,所述聚二甲基硅氧烷弹性层具有供神经细胞突起延伸的微流管道,所述通孔与基底形成用于容纳微球的小室;所述通孔横截面的边长或直径为微球直径的 10^0 - 10^2 倍;所述微流管道的高度为3微米-10微米;所述微流管道宽度为5-50微米;所述多层聚二甲基硅氧烷弹性层的下层聚二甲基硅氧烷弹性层的厚度为40-80微米,总厚度为200微米至3毫米;

所述体外培养三维神经网络的装置采用如下方法进行制备,所述制备方法包括:

(a) 经光刻方法得到模板,用聚二甲基硅氧烷对模板上的图案进行翻模,得到具有微流管道的所述聚二甲基硅氧烷弹性层;

(b) 将多层所述聚二甲基硅氧烷弹性层同向叠合,通过氧等离子体处理使相邻两层之间键合,并使相邻两层中所述微流管道的方向为 $30\sim 90$ 度夹角;

(c) 在所述聚二甲基硅氧烷弹性层上打通孔;和

(d) 将所述聚二甲基硅氧烷弹性层有图案的一面与基底贴合,通孔与基底形成所述小室。

2. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述微球为均一直径;所述小室为圆形、长方形或串珠形;以及所述基底为玻璃基底、聚二甲基硅氧烷基底或聚苯乙烯基底。

3. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述微球的直径为30-140微米。

4. 根据权利要求3所述的装置,其特征在于,所述微球的直径为40-100微米。

5. 根据权利要求4所述的装置,其特征在于,所述微球的直径为40-70微米。

6. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述微球是硅硼玻璃微球或水凝胶微球中的任意一种。

7. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述通孔横截面的边长或直径为微球直径的20-80倍。

8. 根据权利要求7所述的装置,其特征在于,所述通孔横截面的边长或直径为微球直径的40-60倍。

9. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述微流管道高度为4-8微米。

10. 根据权利要求9所述的装置,其特征在于,所述微流管道高度为5微米。

11. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述微流管道宽度为10-40微米。

12. 根据权利要求11所述的装置,其特征在于,所述微流管道宽度为20-30微米。

13. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述下层聚二甲基硅氧烷弹性层的厚度为50-70微米。

14. 根据权利要求13所述的装置,其特征在于,所述下层聚二甲基硅氧烷弹性层的厚度为60微米。

15. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述多层聚二甲基硅氧烷弹性层的总厚度为500微米至2.5毫米。

16. 根据权利要求15所述的装置,其特征在于,所述多层聚二甲基硅氧烷弹性层的总厚度为1毫米至1.5毫米。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的装置的制备方法,其特征在于,所述方法包括:

(a) 经光刻方法得到模板,用聚二甲基硅氧烷对模板上的图案进行翻模,得到具有微流

管道的所述聚二甲基硅氧烷弹性层；

(b) 将多层所述聚二甲基硅氧烷弹性层同向叠合,通过氧等离子体处理使相邻两层之间键合,并使相邻两层中所述微流管道的方向为30~90度夹角;

(c) 在所述聚二甲基硅氧烷弹性层上打通孔;和

(d) 将所述聚二甲基硅氧烷弹性层有图案的一面与基底贴合,通孔与基底形成所述小室。

18. 根据权利要求17所述的方法,其特征在于,所述相邻两层中所述微流管道的方向为90度夹角。

19. 根据权利要求1至16中任一项所述的装置的使用方法,其特征在于,所述方法包括微球的自组装、将神经细胞种植在所述微球的表面和将黏附有神经细胞的微球放入小室中进行培养;其中在种植神经细胞之前先种植胶质细胞。

20. 根据权利要求19所述的方法,其特征在于,所述神经细胞为原代神经细胞。

21. 根据权利要求1至16中任一项所述的装置在用于非诊断或非治疗目的的药物筛选中的应用。

一种采用微流控芯片构建三维神经网络的装置及其制备和使用方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学领域,更具体地涉及在体外构建三维神经网络模型的方法。

背景技术

[0002] 在具有神经系统的生物体内,各器官、系统的功能和各种生理过程都在神经系统的直接或间接调节控制下,互相联系、相互影响、密切配合成为一个完整统一的有机体,实现和维持正常的生命活动。此外,神经系统还要对体内各种功能不断进行迅速而完善的调整从而使生物体适应体内外环境的变化。因此,神经系统是生物体内起主导作用的重要功能调节系统。在高等动物,尤其是在哺乳动物中,神经系统是一个由成千上万个神经细胞相互连接形成的多级三维网络,对其组织结构和工作原理的研究对于生物学、医学、药学、组织工程学等来说都非常重要。目前存在的体外神经网络的构建方法包括神经细胞的有序图案化和神经突的可控诱导。

[0003] 微流控技术已发展为研究细胞生物学的有用工具,其可以精确的控制、监控和操纵细胞外微环境,从而实现神经细胞在二维平面上的图案化以及神经突的诱导。

[0004] 中国发明专利(CN101748061A)公开了一种建立神经细胞之间单细胞水平连接的装置和生长连接方法,在覆有促神经细胞黏附的蛋白质条带的基底上放置具有微凹槽单元的聚二甲基硅氧烷(PDMS)印章,将神经细胞送入微凹槽单元并黏附在蛋白质条带上,其突起则沿蛋白条带定向生长而不发生分支,从而获得神经细胞单细胞水平的单线连接。

[0005] Nature Methods(NATURE METHODS,AUGUST2005,VOL.2NO.8,599)曾报道过利用微流控装置长期培养和局限原代中枢神经细胞。所用的微流控装置由PDMS芯片和玻璃片基底组成,构建了两个细胞培养区域以及连接它们的微槽。将神经细胞种在其中一个区域后,由于微槽的局限性,只有神经轴突会伸展到另一个区域中,这种装置可以用于构建中枢神经轴突损伤和再生模型。这项技术可以在二维的平面可控诱导神经突的连接,但这并不能真实反应体内神经网络的组织和功能。因为真实的神经网络不可能是二维的,而是在三维空间存在的。

[0006] 目前已有的在体外构建三维神经网络的方法有利用direct-write assembly技术制备的光聚合水凝胶三维支架,神经细胞在这种支架内形成分支网络(Adv.Funct.Mater.2011,21,47-54)。还有使用硅硼玻璃微球自组装的基底支持神经细胞生长的技术(Ehud Y Isacoff,NATURE METHODS,AUGUST2008,VOL.5NO.8,735),可形成三维的毫米级神经网络,为了提高神经细胞在硅硼玻璃微球上的黏附性,在其表面包覆了一层多聚赖氨酸。虽然这样可以在一定程度上模拟体内三维神经网络的构成,但这只是低级别的神经网络,网络结构不可控且细胞类型分布相对杂乱,而体内真实的神经网络是多级别的,且不同级别的网络上具有特定的细胞亚型,由低级别的神经网络按照高度有序的模式相互连接组成,并且具有标志性的轴突树突极化、兴奋性抑制性分化以及突触发生,同时不同级别的网络上都可测得明显的神经活动。

[0007] 因此,本领域中需要可以在体外构建具有多级结构的、高度有序且相互连通的三维神经网络的装置,其可实现体外神经网络结构与功能的高度统一,最大可能的模拟体内神经网络的真实组织构成。

发明内容

[0008] 本发明提供一种体外培养三维神经网络的装置及其制备方法,并利用这种装置构建具有良好的结构和功能发育的三维神经网络,可以检测到神经网络中具有标志性的轴突树突极化、兴奋性抑制性分化以及突触发生,而且可在不同级别的网络上都测得明显的神经活动,同时提出了在神经组织工程、脑机接口、药物筛选平台构建上的可能应用。

[0009] 本发明的技术方案如下:

[0010] 在本发明的第一方面,提供了一种体外培养三维神经网络的装置,所述装置包括微流控芯片、用于黏附神经细胞的微球和基底,其中所述微流控芯片包括一层或多层PDMS弹性层并具有通孔,所述PDMS弹性层具有供神经细胞突起延伸的微流管道,所述通孔与基底形成用于容纳微球的小室;所述微球优选为均一直径;所述小室优选为圆形、长方形或串珠形;以及所述基底优选为玻璃基底、PDMS基底或聚苯乙烯基底。

[0011] 在本发明的装置中,所述微球的直径可以为30-140微米,优选为40-100微米,更优选为40-70微米。

[0012] 在本发明的装置中,所述微球是硅硼玻璃微球和水凝胶微球中的任意一种。

[0013] 在本发明的装置中,所述通孔横截面的边长或直径为微球直径的100-102倍,优选20-80倍,更优选40-60倍;

[0014] 在本发明的装置中,所述微流管道高度可以为3微米-10微米,优选为4-8微米,最优选为5微米。

[0015] 在本发明的装置中,所述微流管道宽度优选为5-50微米,更优选为10-40微米,最优选为20-30微米。

[0016] 在本发明的装置中,当采用多层PDMS弹性层时,下层PDMS弹性层的厚度为40-80微米,优选50-70微米,更优选60微米,且总厚度为200微米至3毫米,优选为500微米至2.5毫米,更优选为1毫米至1.5毫米;在一些实施方案中,总厚度可以为500微米、600微米、700微米、800微米、900微米、1毫米、1.1毫米、1.2毫米、1.3毫米、1.4毫米、1.5毫米、1.6毫米、1.7毫米、1.8毫米、1.9毫米、2.0毫米、2.1毫米、2.2毫米、2.3毫米、2.4毫米、2.5毫米、2.6毫米、2.7毫米、2.8毫米、2.9毫米或3.0毫米。

[0017] 在本发明的装置中,当采用单层PDMS弹性层时,厚度为150微米至3毫米,优选为500微米至2.5毫米,更优选为1毫米至1.5毫米;在一些实施方案中,厚度可以为150微米、200微米、250微米、300微米、350微米、400微米、450微米、500微米、600微米、700微米、800微米、900微米、1毫米、1.1毫米、1.2毫米、1.3毫米、1.4毫米、1.5毫米、1.6毫米、1.7毫米、1.8毫米、1.9毫米、2.0毫米、2.1毫米、2.2毫米、2.3毫米、2.4毫米、2.5毫米、2.6毫米、2.7毫米、2.8毫米、2.9毫米或3.0毫米

[0018] 在第二方面,本发明提供了根据第一方面所述的装置的制备方法,其特征在于,所述方法包括(a)经光刻方法得到模板,用PDMS对模板上的图案进行翻模,得到具有微流管道的所述PDMS弹性层;(b)任选地,将多层所述PDMS弹性层同向叠合,通过氧等离子体处理使

相邻两层之间键合,并使相邻两层中所述微流管道的方向成30~90度夹角,优选为90度夹角;(c)在所述PDMS弹性层上打通孔;和(d)将所述PDMS弹性层有图案的一面与基底贴合,通孔与基底形成所述小室。

[0019] 其中同向是指每层PDMS弹性层上有图案的一面均朝向同一方向。

[0020] 在第三方面,本发明提供了根据第一方面所述的装置的使用方法,其特征在于,所述方法包括微球的自组装、将神经细胞种植在所述微球的表面和将黏附有神经细胞的微球放入小室中进行培养。

[0021] 优选地,为了保证微球和神经细胞组成的结构的稳定性,在种植神经细胞之前先种植胶质细胞,提高神经细胞的黏附性。

[0022] 优选地,种植在所述微球的表面的神经细胞为原代神经细胞

[0023] 在第四方面,本发明提供了根据第一方面所述的装置在神经细胞和分子生物学、神经组织工程、脑机接口和药物筛选中的应用。

[0024] 有益效果:

[0025] (1)本发明的装置制备和使用方法都简单易行,便于推广应用。

[0026] (2)采用本发明的装置形成的三维神经网络具有多级结构、高度有序且相互连通的特征,并且形成了标志性的轴突树突极化、兴奋性抑制性分化以及突触发生,并且在较低级别的自组装三维网络中和有序连接的高级别神经网络中均测得明显的神经活动。

[0027] (3)采用本发明的装置形成的神经网络较现有方法更接近体内真实情况,且细胞观察方便。

附图说明

[0028] 图1显示硅硼玻璃微球的自组装以及神经细胞在硅硼玻璃上生长。图1A是硅硼玻璃微球自组装过程的示意图。图1B-1E是神经细胞在硅硼玻璃微球上粘附并生长的扫描电镜照片。

[0029] 图2显示在自组装的硅硼玻璃微球支架上形成三维神经网络及三维神经网络中的功能分化。图2A是支架上生长的三维神经网络的荧光照片。图2B是三维神经网络中神经细胞兴奋性和抑制性功能分化的统计图。

[0030] 图3显示胶质细胞包裹的水凝胶微球自组装支架上,生成三维神经网络。

[0031] 图4显示本发明的装置中微流控小室的几何限制帮助硅硼玻璃微球支架的组装,以及微流控芯片引导下的两个小室中三维神经网络间的有序连接以及多级神经网络在芯片中生长。图4A是微流控芯片引导下,两个小室中分别组装成有序三维神经网络,并在两者间生成有序连接的示意图。图4B是在微流控芯片中生成的多级神经网络荧光照片。图4C是一个小室中的三维神经网络向另一个小室中伸出突起以形成连接的荧光照片。

[0032] 图5显示本发明的装置的制备过程以及采用本发明的装置所制备的多级三维神经网络中多层、多方向的相互连接。图5A是多层微流控芯片制备过程的示意图。图5B是在本发明装置中多级三维神经网络多层、多方向连接的荧光照片。

[0033] 图6显示本发明的装置中,微流控芯片两个小室内三维支架上生长的神经网络可进行钙信号测量的实例。图6A是钙信号荧光序列中的一帧照片。图6B是图6A中9号和12号神经细胞钙信号的序列。图6C是图6A中所有神经细胞两两之间在时域上的相关系数矩阵。图

6D是图6A中所有神经细胞两两之间的归一化距离矩阵。

具体实施方式

[0034] 下面结合附图并通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。

[0035] 实施例1原代神经细胞和胶质细胞的获取和培养

[0036] (一)原代神经细胞

[0037] 1. 分离全脑。取怀孕16-18天的SD大鼠的胚胎。用眼科镊剥除胎鼠头部皮肤和头盖软骨,取出全脑,置于解剖液中。解剖液为无钙、镁的hanks缓冲液,提前置于冰上预冷。

[0038] 2. 分离特定组织,如大脑皮层或海马组织。于解剖镜下用尖头镊划断大脑两个半球间的胼胝体,去除蛛网膜。若需分离大脑皮层,则将两个大脑半球的皮层部分剥离,置于冰上的解剖液中。若需分离取海马组织,则在去除蛛网膜后,将两个大脑半球内的海马分别剥离,置于冰上的解剖液中。

[0039] 3. 消化。用眼科剪将取出的步骤2中取出的组织剪碎,加入不含酚红的胰蛋白酶,在37℃水浴消化15分钟,以破坏细胞之间的连接。胰蛋白酶溶液工作浓度为0.25%。

[0040] 4. 制备细胞悬液。消化结束后,用预热的含血清的种植液终止消化。种植液为DMEM/F12培养基混合10%胎牛血清。用种植液洗2-3遍,以彻底去除胰酶。用移液器吹打,使细胞成为较为均匀的悬液。

[0041] 5. 离心。将细胞悬液静置约2分钟,使未能消化完全的细小组织块沉淀。取上层细胞悬液离心3分钟,转速为1300转/分钟。

[0042] 6. 重悬。弃上清液,加入适量种植液,用移液器吹打均匀,得到的细胞悬液可用于原代神经细胞培养。

[0043] 7. 培养。置于37℃,5%二氧化碳的无菌培养箱中培养。在显微镜下观察,待细胞贴壁后,将种植液置换为预热的培养液。培养液为neurobasal培养基混合2%B27因子和1% GlutaMAX-1。长期培养时,每3天用预热的培养液半量换液一次。

[0044] (二)原代星形胶质细胞

[0045] 1. 细胞悬液制备。取出生第二天的SD大鼠,参照“原代神经细胞”1-4步。得到较为均匀的细胞悬液。其中第2步中分离的组织为大脑皮层。

[0046] 2. 过滤、离心。将细胞悬液静置约2分钟,使未能消化完全的细小组织块沉淀。取上层细胞悬液,用200目的滤网过滤,过滤后得到的细胞悬液离心2分钟,转速为1100转/分钟。

[0047] 3. 重悬。弃上清液,加入适量种植液,用移液器吹打均匀,得到的细胞悬液加入六孔板中,置于37℃,5%二氧化碳的无菌培养箱中培养。

[0048] 4. 梯度贴壁。将六孔板中的细胞悬液移入另一个六孔板中,六孔板提前用多聚赖氨酸孵育两小时以上。注意避免絮状物。

[0049] 5. 纯化。24小时后,给六孔板中的细胞换液。之后每3天换一次液。待细胞在六孔板底面基本铺满后,将胰酶加入孔板,然后迅速吸出,以除去部分混杂的神经细胞。待细胞重新贴壁后,将六孔板置于37℃摇床震荡10小时,转速为220转/分钟,之后迅速换液,可除去神经细胞和少突胶质细胞。重复摇床处理步骤至六孔板中只剩下星形胶质细胞。

[0050] 6. 种植。纯化后的细胞,需使用时,用预热的磷酸盐缓冲液洗一遍,加入预热的胰酶于37℃下消化5分钟,加入种植液终止消化。用移液器将孔板中的细胞吹打均匀,将细胞

悬液收集至离心管中离心2分钟,转速为1100转/分钟。弃上清,加入适量种植液吹打均匀,所得细胞悬液即可用于原代星形胶质细胞种植。

[0051] 7.培养。纯化后的细胞或种植后的细胞需长期培养时,每3天用预热的种植液换一次液。

[0052] 实施例2玻璃微球的自组装以及细胞的种植

[0053] 微球的自组装

[0054] 将微球的悬浮液滴在玻璃片的表面,微球在重力驱动下从基底开始组装,组装满底层后再逐层组装上层,通过对基底大小和微球总体积的计算,可以调控组装的层数(见图1A)。

[0055] 具体为:

[0056] 1玻璃微球的前处理:将63微米硅硼玻璃微球(MO-SCI Specialty Products)放到75%的乙醇溶液中过夜灭菌,并用蒸馏水洗涤三次除去乙醇。然后将微球放入多聚赖氨酸(PDL)溶液中孵育过夜,用蒸馏水洗涤三次备用。

[0057] 其中,上述硅硼玻璃微球的直径也可以是45微米、90微米、125微米。

[0058] 2用吸管将玻璃微球的PDL悬浮液滴在玻璃片上,微球在重力驱动下从基底开始组装,成为紧致的单层结构。将原代星形胶质细胞或神经细胞悬液种植于微球的单层组装结构上。

[0059] 3.粘附细胞的微球的组装。待细胞贴壁后将粘附了细胞的微球收集,重新撒在具有几何限制的微流控芯片的小室中,使微球携带细胞形成三维自组装结构。通过调控微球的数量来控制三维结构的层数。

[0060] 其中,上述几何限制的微流控芯片的小室形状可以是圆形、长方形、串珠形其中任意一种。几何限制的边长或直径应在微球直径的100-102倍之间,对于微球形成规则的组装结构最为有效,若该尺寸恰为微球直径的整数倍,则理论上可实现完美组装。

[0061] 4.载有细胞的三维结构的长期培养。根据细胞的不同种类,参照原代细胞培养的条件选择培养基和换液。

[0062] 实施例3水凝胶微球的自组装及细胞的种植(见图3)

[0063] 实验步骤参照实施例2。水凝胶微球可购买商品化产品。也可由微流控芯片制备,具体方法可参照[Lab on a Chip,2008,8,2,198-220.]。其尺寸范围参照实施例2。区别在于第一步:灭菌的酒精剂量需增大,防止在水凝胶微球中含水量较高的影响下,低于有效灭菌浓度范围。酒精灭菌后水洗时间每遍延长至1小时以上,保证水凝胶内的酒精充分扩散出来。多聚赖氨酸孵育后种植细胞前,用种植液孵育5小时以上并更换一次种植液,保证水凝胶内的液体为适于细胞生存的渗透压。

[0064] 图3显示水凝胶微球支架上形成的三维神经网络的荧光照片。水凝胶微球自组装形成三维支架后,在支架表面种植一层原代胶质细胞,待胶质细胞生长至包裹大部分支架表面后,种植神经细胞,并培养至形成三维神经网络。GFAP为胶质细胞特异性抗体,Tuj1为神经细胞特异性抗体。

[0065] 实施例4

[0066] 单层微通道连接的神经网络

[0067] 1微流控芯片的制备

[0068] 1) 聚二甲基硅氧烷芯片模板的制备, 主要过程为光刻, 即利用光刻胶在紫外线照射下可改变性质的特点制作与设计好的掩模上的图案完全一致的光刻胶硅片模板, 具体制备方法可参照[Y.Xia,G.Whitesides,Annual Review of Materials Science,1998,28,15], 在商用晶面为<111>的单晶硅片上制备具有一个微凸型结构;

[0069] 2) 聚二甲基硅氧烷芯片的制备, 方法为软刻蚀技术, 制备材料为聚二甲基硅氧烷(PDMS,polydimethylsiloxane,184silicone elastomer, 购自Dow Corning), 其在普通状态下是透明而粘稠的液体, 经与固化剂反应(184silicone elastomer curing agent, 购自Dow Corning) 并加热后可固化。利用PDMS可以将硅片模板上的突起图形转换为对应的凹型图形, 从而得到一与所述凸型条微结构相对应的聚二甲基硅氧烷芯片, 其下表面的微凹槽的高度为5微米, 宽度在5-50微米范围内选取, 间距在30-50微米范围内选取。

[0070] 3) 在PDMS芯片上打通孔, 其中通孔的数目为2个或以上, 通孔直径为微球直径的 10^0-10^2 倍之间, 通孔边缘的最近距离可在500-2000微米之间调节。之后将芯片有图案的一面贴合在玻璃片上, 通孔与玻璃基底形成小室。

[0071] 其中, 通孔的形状可以是圆形、长方形、串珠形其中的任意一种。

[0072] 2细胞培养

[0073] 在神经细胞黏附在微球上后, 我们小心的收集黏附有神经细胞的微球, 并把它们加入微流芯片的小室内(见图4A)。用含2%B27和1%Glutamax-1的Neurobasal神经培养基(GIBCO), 每四天替换一半。

[0074] 实施例5

[0075] 多层微通道连接神经网络(见图5)

[0076] 1多层微通道芯片的制备

[0077] 1) 通过光刻的方法获得翻模模板, 模板基底为硅片, 凸起图案由光刻胶构成;

[0078] 2) 将模板放到匀胶机上, 倒入液态的PDMS, 转速为1200-2000转/分钟, 之后将载有PDMS的模板放入烘箱中, 加热固化后得到相应厚度为80-40微米的PDMS薄膜, 薄膜的一面具有微流通道, 其中通道的高度可以在5-10微米范围内选择, 宽度可在5-50微米范围内选择, 每片芯片上通道数量在 10^2-10^3 数量级。

[0079] 3) 将两片上述PDMS薄膜经过氧等离子体处理后键合成一个多层微通道芯片, 一片有图案的一面与另一片无图案的一面贴合, 并且上下两层通道方向相互垂直;

[0080] 4) 在PDMS芯片上打通孔, 其中通孔的数目为2个以上, 通孔直径为微球直径的 10^0-10^2 倍之间, 通孔边缘的最近距离可在500-2000微米之间调节。之后将芯片有图案的一面贴合在玻璃片上, 通孔与玻璃基底形成小室。

[0081] 其中, 通孔的形状可以是圆形、长方形、串珠形其中的任意一种。

[0082] 2细胞培养

[0083] 在神经细胞黏附在微球上后, 我们小心的收集黏附有神经细胞的微球, 并把它们加入微流芯片的小室内。用含2%B27和1%Glutamax-1的Neurobasal神经培养基(GIBCO), 每四天替换一半。

[0084] 实施例6

[0085] 微通道芯片上多级别神经网络模拟不同脑区间相互作用

[0086] 在芯片内不同小室种植不同亚型的神经细胞(如海马区中的椎体神经细胞和大脑

皮层中的神经细胞等),诱导各小室的低级神经网络之间形成连接,构建含不同细胞类型的高级别三维神经网络,从而模拟生理和病理状态下不同脑区之间的神经细胞的连接和相互作用。

[0087] 具体为:

[0088] 1微通道芯片的制备

[0089] 参照实施例4和实施例5中微流控芯片制备和多层微通道芯片制备的步骤。根据需要选择芯片层数。

[0090] 2细胞培养

[0091] 1)细胞选取和分离。根据具体研究内容选定脑区,分离细胞的步骤参照实施例1中原代神经细胞部分。

[0092] 2)在神经细胞黏附在微球上后,我们小心的收集黏附有神经细胞的微球,并把它们加入微流芯片的小室内。用含2%B27和1%Glutamax-1的Neurobasal神经培养基(GIBCO),每四天替换一半。

[0093] 实施例7

[0094] 扫描电子显微镜表征实施例2中神经细胞在自组装结构单元上生长情况

[0095] 具体步骤:

[0096] 在37°C将黏附着神经细胞的微球用D-PBS洗涤一次,之后用2.5%戊二醛水溶液在室温条件下固定4小时。样品依次在25%,50%,70%,85%,95%和100%酒精中梯度脱水,每个浓度30分钟。经过临界点干燥(CPD030Critical Point Dryer,Bal-Tec),通过扫描电子显微镜(FEI quanta200)观察单个和多个微球上神经细胞的粘附和生长情况(见图1B-1E)。

[0097] 实施例8

[0098] 激光共聚焦显微镜观察实施例2中几何限制微球自组装体上形成的三维神经网络

[0099] 具体步骤:

[0100] 在37°C将样品用D-PBS洗涤一次,之后用4%多聚甲醛固定30分钟。细胞膜用0.3% Triton X-100渗透15分钟。在用10%山羊血清进行非特异性封闭1小时后,用神经细胞和胶质细胞特异性抗体(作用于神经细胞的抗体有Tuj1(Sigma),smi-312(Covance),MAP2(Millipore),CaMKII(Invitrogen),GABA(Sigma),胶质细胞抗体有GFAP(Sigma))在4°C下孵育过夜,之后用相应的二抗染色用于观察(Alexa Fluor488,633或555(sigma))。

[0101] 图2A中,用神经细胞特异性抗体Tuj1标记了形成的三维神经网络,显示了自组装多层支架上神经网络的生长情况。

[0102] 本发明还表征了神经网络中神经细胞的功能分化情况。图2B给出了四批细胞的统计结果,每批60-110个神经细胞。结果显示兴奋性和抑制性神经细胞占总体的比例大约分别为70%和30%,与体内神经网络和体外二维神经网络研究文献报道相符,说明三维神经网络形成了很好的功能性分化和兴奋-抑制平衡。

[0103] 实施例9

[0104] 激光共聚焦显微镜观察实施例4中三维神经网络的结构

[0105] 以不同的荧光染料标记不同小室中的三维神经网络,从而观察各低级别神经网络之间的连接形成高级别神经网络的方式和各神经网络之间的相互作用。

[0106] 图4B为绿色荧光活细胞染料Tubulin tracker Green(Molecular Probes),标记

活的神经细胞的细胞骨架中的微管。具体实验步骤如下：

[0107] 1.将样品用预热的无钙镁的hanks缓冲溶液洗一次；

[0108] 2.用DMSO溶解Tubulin tracker Green和等体积的20%浓度的F127,其中Tubulin tracker Green的最终工作浓度为250nM；

[0109] 3.将样品在37℃,5%CO₂培养箱中避光孵育30分钟；

[0110] 4.用hanks缓冲液洗去没有结合的染料,在荧光显微镜下用488nm激发光观察。

[0111] 图4C为脂溶性红色荧光染料DiI (Molecular Probes) 标记神经细胞的细胞膜。将分离的神经细胞悬液与DiI染料混合,其中DiI工作浓度为1~5nM,将染色后的细胞种植与微球上培养成三维神经网络。

[0112] 图4A示意了两个低级别网络中即微球自组装体的神经细胞通过微流控通道相互连接。

[0113] 实施例10

[0114] 激光共聚焦显微镜观察实施例5中三维神经网络的结构。

[0115] 图5A示意了多层芯片上三维神经网络的构建过程。图5B中绿色荧光为Tubulin Tracker Green,标记神经细胞的微管(同实施例9)。

[0116] 结果显示,微球支架上自组装的低级别神经网络定位在小室中,随着神经细胞生长,网络中伸出突起,在上下两层微流控通道的调控下沿通道内生长,并进入其他自组装神经网络的区域,从而形成更高级别的多方向连接的更复杂的三维神经网络。

[0117] 实施例11

[0118] 三维神经网络的信号检测(图6)

[0119] 用钙成像的方法对神经活动进行表征。

[0120] 钙成像的原理是神经活动发放时,神经细胞钙库内储存的钙离子会大量进入胞浆,活动发放结束时,胞浆内过量的钙离子重新回到钙库,因此钙离子的浓度与神经活动过程相偶联。钙离子染料Fluo4用荧光标记了钙离子,因此荧光强度的增减反映了钙离子的浓度,进而反映了神经活动的过程。沿时间轴对同一位置进行等间隔拍摄,拍摄间隔小于1秒,持续时间为10分钟。图6A为该序列中的一张。图中的圆圈标记了所有荧光强度有变化的神经细胞,用数字人为对其进行标号,方便后续统计。阴影分别标记了两组神经细胞,每组内的神经细胞活动发放在频域上具有很好的一致性。从所有神经细胞中随机选取两个,示意了其活动发放曲线(图6B)。纵轴是钙信号的荧光强度,横轴是时间。随后对两两神经细胞之间发放曲线的相关性(图6C)和归一化距离(图6D)进行统计,分别得出一个沿对角线对称的矩阵。横轴和纵轴都是按序号排列的神经细胞。最后,对两两神经细胞活动的相关性和距离再次做相关性分析,发现随着神经细胞之间距离的增大,活动相关性减小。这与著名的Hebb定律相吻合,即连接在一起的神经细胞活动一致。

[0121] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的详细结构特征以及方法,但本发明并不局限于上述详细结构特征以及方法,即不意味着本发明必须依赖上述详细结构特征以及方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明所选用部件的等效替换以及辅助部件的增加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

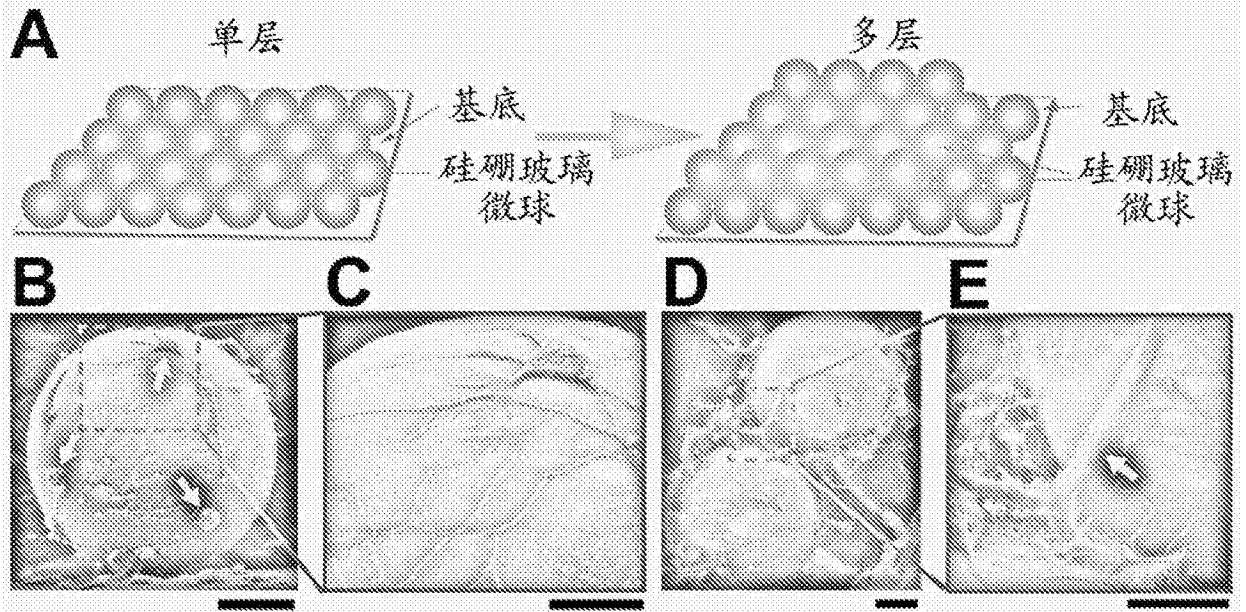


图1

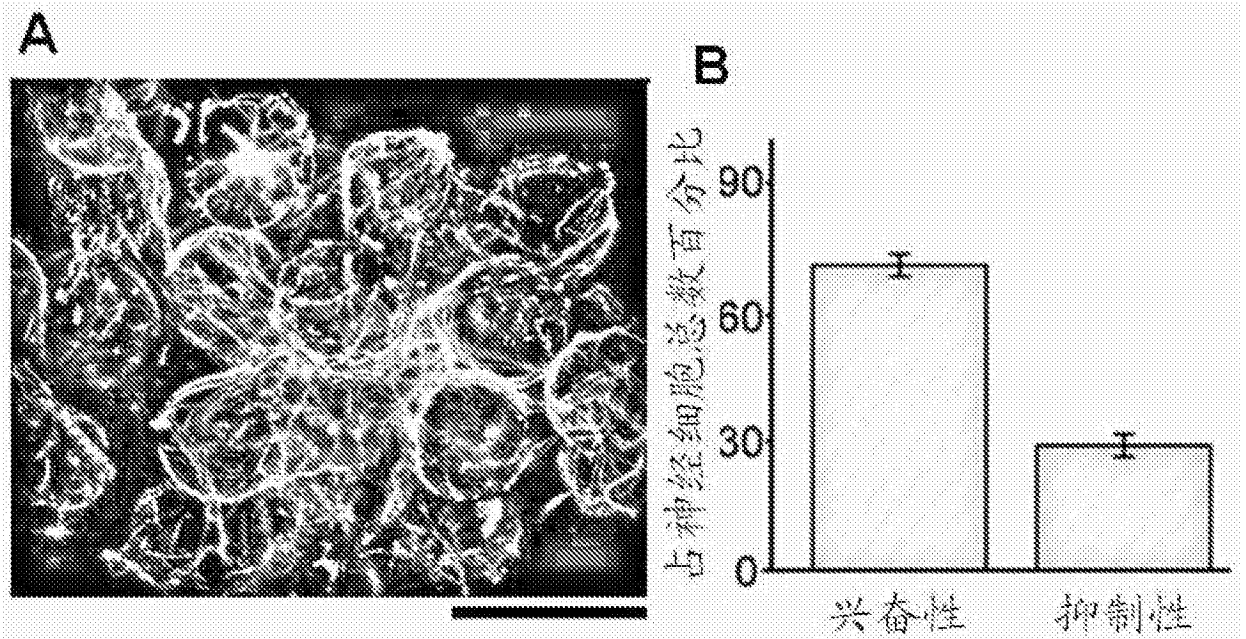


图2

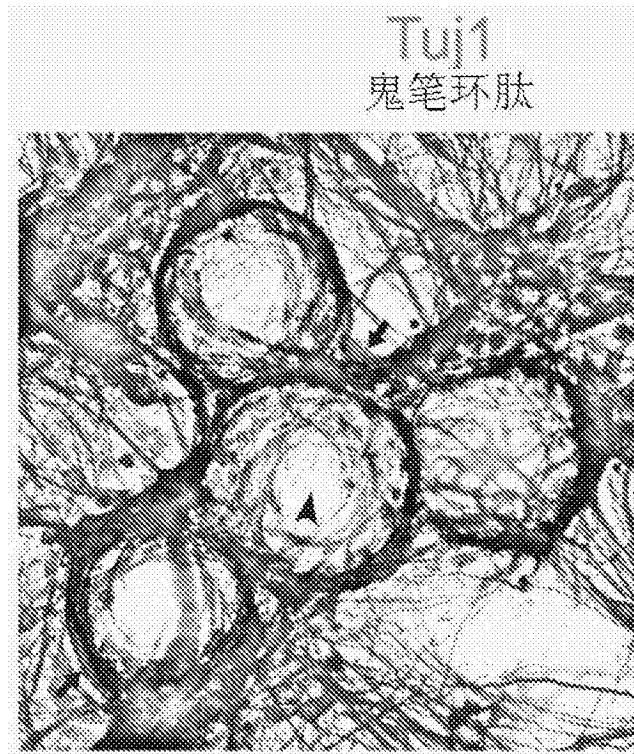


图3

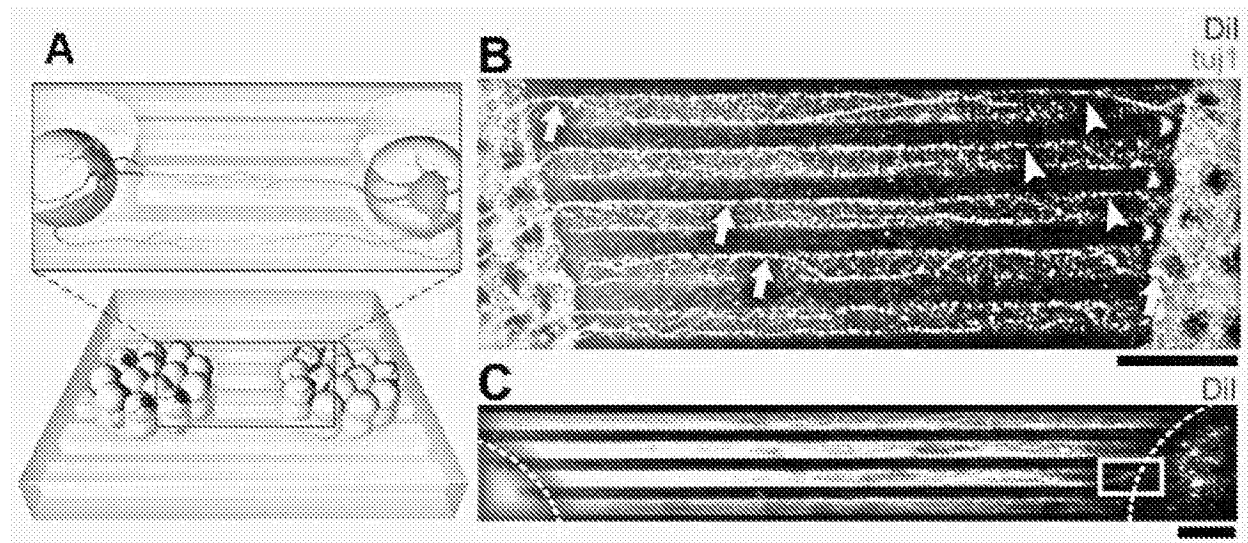


图4

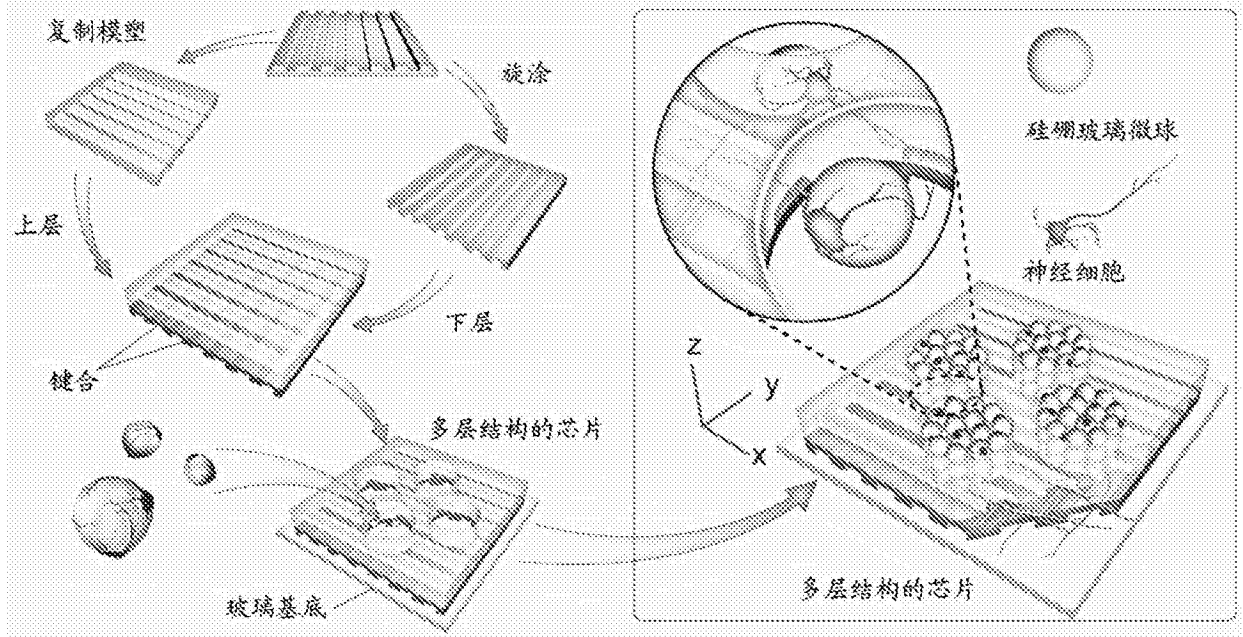


图5A

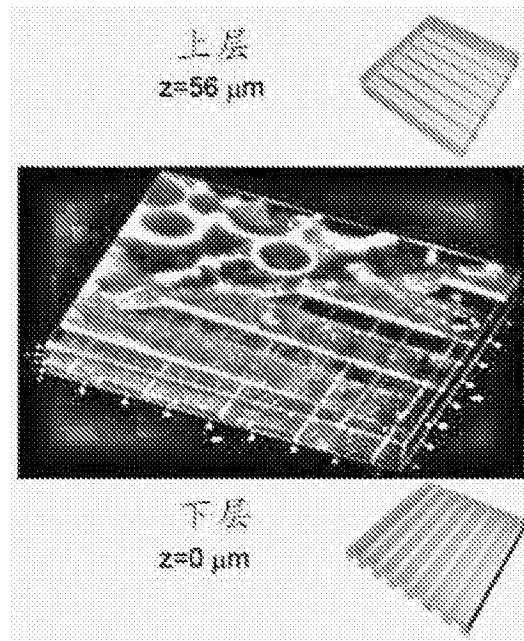


图5B

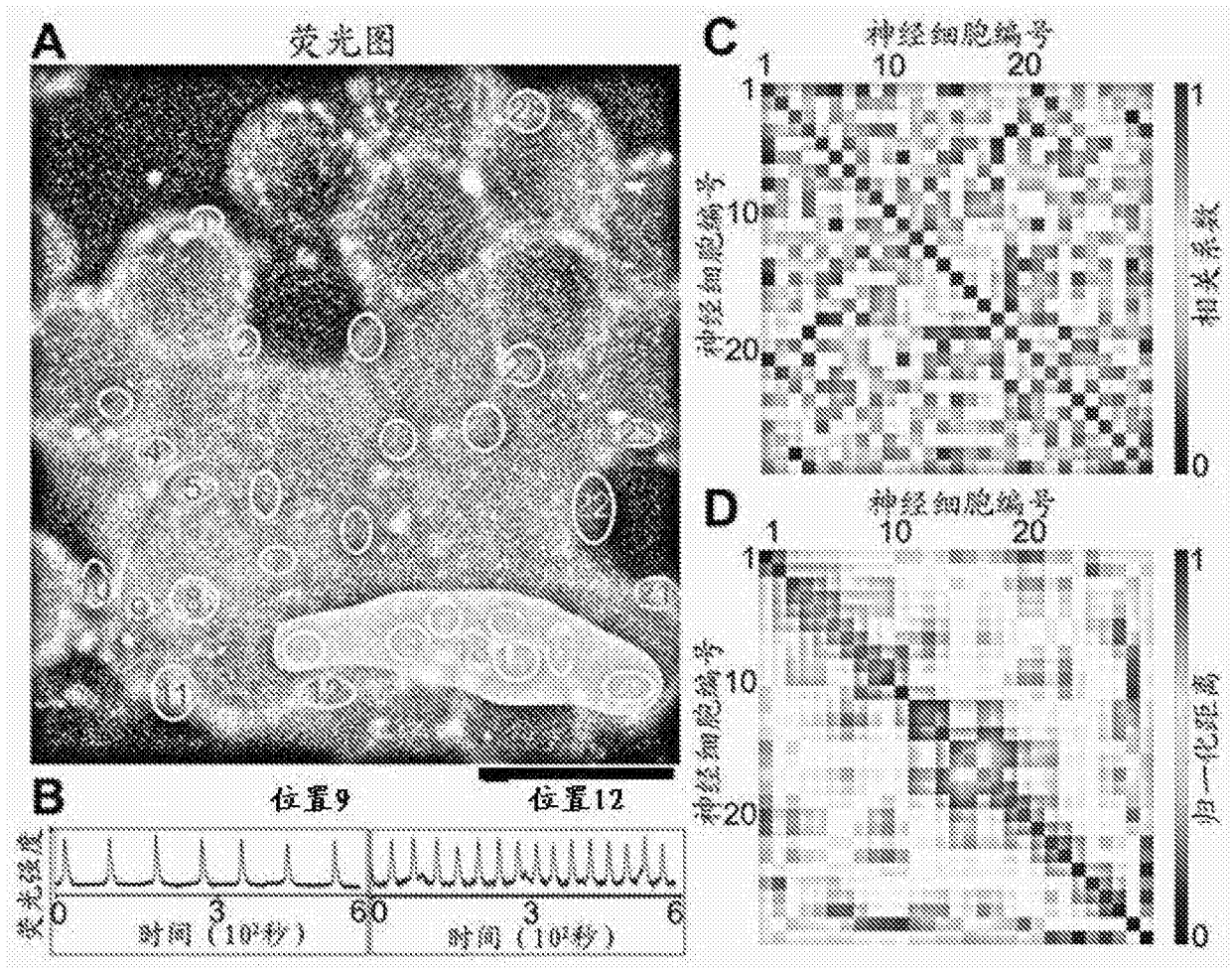


图6