

一种新型高通量三维脑细胞芯片的研制及农药神经毒性评价应用

赵晨羽, 厉海笛, 陈晓萍

浙江工业大学 生物工程学院, 浙江 杭州 310032

赵晨羽, 厉海笛, 陈晓萍. 一种新型高通量三维脑细胞芯片的研制及农药神经毒性评价应用. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2543-2553.

Zhao CY, Li HD, Chen XP. Development of a novel high throughput brain-on-chip with 3D structure and its application in evaluation of pesticide-induced-neurotoxicity. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2543-2553.

摘要: 为了模拟体内脑组织细胞的三维生长环境, 高效开展脑疾病和有关药物的研究工作, 文中设计和制造了一种新型高通量三维脑细胞芯片。芯片由多孔滤网和三维脑细胞颗粒构成, 装载于常规的 96 孔细胞培养板上使用。多孔滤网和细胞颗粒模具采用计算机建模、3D 打印阳模、琼脂糖-PDMS 两次翻模等技术制造, 三维脑细胞颗粒是将小鼠胚胎脑细胞与海藻酸钠的混悬液浇灌和凝固于细胞颗粒模具, 再将形成的水凝胶切割而成。用装载好的脑细胞芯片进行农药神经毒性测定, 以 0、10、30、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 的毒死蜱或吡虫啉暴露胚胎脑细胞颗粒, 培养完毕移去多孔滤网, 方便地将细胞颗粒与培养液进行分离, 然后检测细胞增殖、乙酰胆碱酯酶活力和乳酸脱氢酶释放以评估毒性。研究表明, 在装载到 96 孔细胞培养板的多孔滤网中, 胚胎脑细胞能够在水凝胶颗粒中正常生长增殖。在农药神经毒性测试中, 毒死蜱与吡虫啉都呈现了量效相关的细胞生长增殖抑制, 也表现出乙酰胆碱酯酶活力抑制、乳酸脱氢酶释放的毒性效应, 但吡虫啉的作用明显弱于毒死蜱。文中构建了一种新型脑细胞芯片, 可以结合酶标仪方便快速地检测药物对脑神经组织的毒性效应, 也可以应用于药效和疾病机制研究。

关键词: 脑芯片, 三维细胞培养, 高通量检测, 神经毒性, 农药

Received: August 25, 2020; **Accepted:** November 30, 2020

Supported by: Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (No. LY15H260003).

Corresponding author: Xiaoping Chen. Tel: +86-571-88320823; E-mail: chxp@zjut.edu.cn

浙江省自然科学基金 (No. LY15H260003) 资助。

网络出版时间: 2021-01-06

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210104.1328.005.html>

Development of a novel high throughput brain-on-chip with 3D structure and its application in evaluation of pesticide-induced-neurotoxicity

Chenyu Zhao, Haidi Li, and Xiaoping Chen

College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, Zhejiang, China

Abstract: We designed and fabricated a novel high throughput brain-on-chip with three dimensional structure with the aim to simulate the *in vivo* three-dimensional growth environment for brain tissues. The chip consists of a porous filter and 3D brain cell particles, and is loaded into a conventional 96-well plate for use. The filter and the particle molds were fabricated by using computer modeling, 3D printing of positive mold and agarose-PDMS double reversal mold. The 3D cell particles were made by pouring and solidifying a suspension of mouse embryonic brain cells with sodium alginate into a cell particle mold, and then cutting the resulting hydrogel into pieces. The loaded brain-on-chip was used to determine the neurotoxicity of pesticides. The cell particles were exposed to 0, 10, 30, 50, 100 and 200 $\mu\text{mol/L}$ of chlorpyrifos or imidacloprid, separated conveniently from the medium by removing the porous filter after cultivation. Subsequently, cell proliferation, acetylcholinesterase activity and lactate dehydrogenase release were determined for toxicity evaluation. The embryonic brain cells were able to grow and proliferate normally in the hydrogel particles loaded into the filter in a 96-well plate. Pesticide neurotoxicity test showed that both chlorpyrifos and imidacloprid presented dose-dependent inhibition on cell growth and proliferation. Moreover, the pesticides showed inhibition on acetylcholinesterase activity and increase release of lactate dehydrogenase. However, the effect of imidacloprid was significantly weaker than that of chlorpyrifos. In conclusion, a novel brain-on-chip was developed in this study, which can be used to efficiently assess the drug neurotoxicity, pharmacodynamics, and disease mechanism by combining with a microtiterplate reader.

Keywords: brain-on-chip, 3D cell culture, high-throughput detection, neurotoxicity, pesticides

脑是机体最重要的组织器官，它的异常会导致阿尔茨海默病、帕金森氏综合征等老年退行性疾病，儿童孤独症、抑郁症、精神分裂症等认知行为异常，中风、颅脑外伤等缺血缺氧性损伤，而其疾病机制研究与药物研发都需要大量的实验研究^[1-2]。

脑细胞原代培养是脑疾病机制研究与药物研发中的常用技术。与传代培养的神经细胞系相比，原代培养的脑细胞难以持久存活，但却能够更好地模拟体内脑组织的发育衍变过程。原代培养的脑细胞通常取自胚胎早中期的端脑或胚胎后期/新生脑的海马脑区，这些区域的细胞主要为神经干/祖细胞，具有旺盛的生长增殖能力。尤其是胚胎早中期的端脑，是整个脑发生的源头，其神经干/祖细胞通过增殖发育衍变，能生成脑内所有类型的细胞^[3]。因此，在药物毒性与效能研究中采用胚胎早中期端脑原代细胞，能比较全面地体现

药物对体内脑神经系统的作用。

常规的细胞培养呈现二维即平面生长的模式，细胞沿培养皿表面单层生长，这与体内机体组织立体多层的三维生长模式有明显不同，这种差别影响了细胞模型对体内过程的精确评估。胚胎早中期的神经干/祖细胞具有强大的生长增殖和发育分化潜能，在体外培养中能诱导分化生成细胞突起，形成神经网络连接，也能够相互聚集成球，并进一步发育为神经管样的三维脑组织结构^[4]。在三维培养中，常采用胶原、明胶、海藻酸钠等成分制成水凝胶，为细胞生长提供预定形态的三维支架^[5]。由于三维细胞更接近于体内真实组织的形态结构，近年来，三维细胞培养正在成为药物研究中有力的新型手段。

传统的细胞实验需要经过比较复杂的前处理过程才能进行药效检测，包括培养液分离、细胞

处理等一系列步骤,耗时耗力而且增加了实验的不确定因素。为了更加高速有效地开展药物研究,2015年以来,一种新兴的脑芯片(Brain-on-chip)技术快速兴起,其源自计算机芯片技术,采用光刻与软光刻、印章印刷、3D打印等方法精心制作带有液体微通道和细胞培养槽阵列的微小芯片,接种活的脑神经细胞培养,能结合高通量检测设备快速监测细胞的代谢与机能,大大提高了研究工作的效率^[6]。目前报道的脑芯片主要有血脑屏障芯片、神经网络芯片、神经发育芯片、神经退行性疾病芯片等^[7-8]。

本文报道一种自行研制的高通量三维脑细胞芯片,采用3D打印技术制造细胞颗粒模具和芯片滤网,用3%海藻酸钠和小鼠胚胎14 d端脑细胞制备三维细胞凝胶颗粒,其三维水凝胶包埋的细胞生长环境接近体内真实的组织结构,能更好地模拟脑神经组织的生理机能^[9]。将细胞颗粒和滤网装载于96孔酶标板,则可连接酶标仪进行高效快速的检测。这种新型设计的脑细胞芯片方便快捷,可以在普通细胞实验室用于脑疾病研究和药理毒理评价。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

3D打印光敏树脂购自Anycubic深圳市纵维立方科技有限公司,3D打印聚乳酸线材(Polylactic acid, PLA)购自深圳创想三维科技有限公司,聚二甲基硅甲烷(Polydimethylsiloxane, PDMS)购自上海德计商贸有限公司,海藻酸钠购自美国Sigma公司,DMEM/F12培养液购自美国Hyclone公司,胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司,60 mm细胞培养皿、96孔细胞培养板购自美国Corning公司,乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒、CCK-8试剂盒、红细胞裂解液、DAPI染色液购自碧云天生物技术研究所,毒死蜱(纯度

99.1%)来自浙江新农化工股份有限公司,吡虫啉(纯度98%)来自美国Sigma公司。SPF级ICR小鼠,购自苏州昭衍新药研究中心有限公司,动物生产许可编号:SCXK(苏)2018-0006,动物实验许可编号:20190301013。

1.1.2 仪器

光固化3D打印机(Anycubic深圳市纵维立方科技有限公司,型号Photon S),熔融法3D打印机(深圳创想三维科技有限公司,型号CR-3S),电热恒温鼓风干燥机(上海森信实验仪器有限公司,型号DGG-9030A),超净工作台(苏州净化设备有限公司,型号SW-CJ-1FD),二氧化碳培养箱(TermoForma,型号Hepafilter),酶联免疫测定仪(瑞士Tecan公司,型号Sunrise)。

1.2 方法

1.2.1 多孔滤网与细胞颗粒模具的设计与制备

首先采用AutoCAD软件设计出多孔滤网的虚拟模型,设计好的模型以stl格式保存,导入光固化3D打印机软件中转换为photons格式,再以光敏树脂为材料,405 nm为光固化激发波长打印制造出滤网实物。

微小的细胞水凝胶颗粒难以直接用模具制备,本实验构建条形凹槽模具用于制备细胞水凝胶微条,后期再经切割得到细胞水凝胶微粒。采用AutoCAD软件设计模具的计算机虚拟模型,用熔融法3D打印机制造出PLA模具阳模,倒入热熔化的3%琼脂糖溶液翻建模具阴模,待琼脂糖凝固后,再倒入按主剂:固化剂=10:1配置好的PDMS预聚液,放置4℃冰箱4-6 h驱除气泡,转移至恒温烘箱55℃预固化2 h,再升温至75℃热固化1 h,最后得到可反复消毒灭菌、易于脱出细胞水凝胶微条的PDMS模具。

1.2.2 胚胎脑细胞的获取和原代培养

参照Azari等^[10-11]的方法进行改良,取胚胎14 d端脑组织作为原代脑细胞培养的来源细胞,其中的细胞主要为胚胎神经干/祖细胞。具体方法

为:将 6-8 周龄的 ICR 小鼠按雌雄 1:1 配对合笼,以阴栓检出法确定母鼠妊娠时日,在妊娠 14 d (GD14) 处死孕鼠,取出胚胎,剥离头部皮肤、颅骨和脑组织上血管,沿颅底切取端脑,剪为 1-2 mm 碎块,用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 溶液消化成单细胞,加入 D-Hank's 液打散、稀释,200 目不锈钢筛网过滤,1 000 r/min 离心后收集沉淀的细胞,加入 DMEM/F12 完全培养液 (内含 10% 胎牛血清,1% 青-链霉素双抗),调整细胞密度至 5×10^5 /mL,接种 60 mm 细胞培养皿,放置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中,24 h 后更换培养液,弃去悬浮未贴壁的细胞,继续培养 2-3 d 后用于后续研究。

1.2.3 海藻酸钠-脑细胞微粒的制备

吸取后弃去上述细胞培养皿中的培养液,用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 溶液消化贴壁生长的胚胎脑细胞,加入 DMEM/F12 完全培养液制成单细胞悬液,调整细胞密度至 4×10^6 /mL,加入等体积的 3% 海藻酸钠溶液混匀,用滴管吸取海藻酸钠-细胞混合液,小心加入灭过菌的 PDMS 模具凹槽,用浸润过 0.1 mol/L CaCl₂ 的透析膜覆盖,15 min 后揭开透析膜,细胞-海藻酸钠溶液已凝固成水凝胶条,脱出水凝胶条,用手术刀切成 20 等份,即为 0.5 mm×0.6 mm×0.6 mm 的三维脑细胞微粒。

1.2.4 芯片装载和三维脑细胞微粒培养

多孔滤网用 75% 乙醇浸泡 20 min 灭菌,再用 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) 反复冲洗 5 遍去除残留的乙醇,将多孔滤网装载于 96 孔细胞培养板,每孔中放入 20 粒脑细胞水凝胶微粒 (即一整条水凝胶分割后的全部微粒),再加入 200 μL 细胞培养液,放置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育。

1.2.5 细胞生长曲线

采用 WST-8 还原法^[12]。在 3D 培养组,取出多孔滤网,连同其中的细胞颗粒一起转移到新的 96 孔培养板,向每孔加入 200 μL 细胞培养液,对照组采用 DMEM/F12 完全培养液,农药组则为

含有 10、30、50、100、200 μmol/L CPF 或 IMI 的 DMEM/F12 完全培养液,检测前 2 h 加入 20 μL CCK-8 检测液,孵育的时间分别为 0 h (d0)、24 h (d1)、48 h (d2)、72 h (d3)、96 h (d4)、120 h (d5)、144 h (d6),然后移去滤网连同其中的细胞颗粒,96 孔板中的培养液直接用于检测 450 nm 的吸光度,再以培养时间为横坐标、OD₄₅₀ 为纵坐标作出细胞生长曲线。在常规 (2D) 培养组,向 96 孔培养板中每孔加入 100 μL 胚胎脑细胞悬液 (细胞密度 7×10^7 个/mL,即每孔加入的细胞量为 7×10^6 ,与 3D 组的细胞量相等),再加入 100 μL DMEM/F12 完全培养液或农药-DMEM/F12 完全培养液,其余步骤与 3D 培养组相同。

1.2.6 细胞核荧光染色

采用 DAPI 染色法。取出多孔滤网,用 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) 冲洗细胞颗粒两遍,将颗粒转移至载玻片,滴加 10 μL DAPI 荧光染料,室温放置 3-5 min, PBS 冲洗 3 遍,盖上盖玻片,荧光显微镜下观察。

1.2.7 蛋白质含量测定

采用 Bradford 法测定样品的蛋白质含量,即酶液 5 μL,生理盐水 5 μL,再加入考马斯亮蓝显色液 200 μL,混匀后静置 5 min,用酶标仪测定 595 nm 处的吸光度。以牛血清白蛋白作为标准品,由标准曲线计算出样品的蛋白质含量。

1.2.8 乳酸脱氢酶 (LDH) 释放

细胞凋亡或坏死时造成细胞膜结构破坏,细胞内容物如 LDH 释放到培养液中,采用 LDH 底物 NAD 进行酶促还原反应生成 NADH,其与中间代谢物 INT 经另一种酶催化生成有色的代谢产物甲臜,经比色测定计算出 LDH 释放量,用于评价药物的细胞毒性^[13]。检测时,取出多孔滤网及其中的脑细胞颗粒,转移至新的 96 孔细胞培养板,每孔加入 LDH 释放液 150 μL,细胞培养箱中孵育 1 h,取出滤网及细胞微粒,孵育液中每孔加入 60 μL 检测工作液,室温下避光反应 30 min,

用酶标仪测定 490 nm 的吸光度。测定反应液蛋白质含量,用每毫克蛋白质含量对测得的 OD 值进行校正,再按(公式 1)计算出 LDH 的相对释放量:

$$\text{LDH 相对释放量 (\%)} = (A_{\text{药物处理}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{最大酶活性}} - A_{\text{对照}}) \times 100\% \quad (\text{公式 1})$$

1.2.9 胆碱酯酶 (AChE) 活力测定

由于培养液中胆碱酯酶活力太低,本文采用 Ellman 斜率法^[14]检测脑细胞微粒内的胆碱酯酶活力。将滤网连同其中的细胞微粒转移到一个新的 96 孔板,每孔加入 100 μL 55 mmol/L 的柠檬酸钠溶液以裂解海藻酸钠水凝胶,15 min 后,1 200 r/min 离心 5 min,弃去清液,用 PBS 反复洗涤 3 次,收集沉淀的细胞,加入 500 μL 细胞裂解液作用 10 min 裂解细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液用于检测,即为酶液样本。

向 96 孔板每孔加入底物硫代乙酰胆碱 20 μL ,显色剂 5',5'-二硫代双 2-硝基苯甲酸 210 μL ,酶液 20 μL ,立刻混匀,用酶标仪连续测定 405 nm 处的吸光度,每分钟 1 次,连续检测 10 min,共 10 次,用测定的 OD 值对时间 t 作图,得到斜率 K (公式 2);测定酶液的蛋白质含量,由斜率 K 除以蛋白质含量得到校正的斜率 K_c (公式 3);再以样品酶液的斜率 K_c 除以对照组斜率 K_0 得到相对酶活力 K_{cr} (公式 4)。

$$K = dOD_{405}/dt \quad (\text{公式 2})$$

$$K_c = K/C_{\text{pro}} \quad (\text{公式 3})$$

$$K_{cr} = K_c/K_0 \quad (\text{公式 4})$$

1.2.10 统计学处理

每组设置 3 个平行样本,实验结果表示为 $\bar{x} \pm s$,用 SPSS 22.0 软件进行样本正态性分布和单因素 ANOVA 分析,以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 具有统计学显著意义。

2 结果与分析

2.1 多孔滤网和细胞颗粒模具

首先设计制造芯片的核心部件多孔滤网和细

胞颗粒模具。多孔滤网的作用是放置在 96 孔细胞培养板中,培养结束时方便分离细胞颗粒和细胞培养液。制备好的多孔滤网 12 \times 8 共 96 个,为中空圆柱体阵列,圆柱体直径 4 mm,高 9 mm,壁厚 0.05 mm,柱体布满筛孔,圆柱体间隔 8 mm,以薄板相连。整个筛板长 11.8 mm,宽 7.8 mm,切合 96 孔细胞培养板内壁(图 1)。

细胞颗粒模具用于制备脑细胞-海藻酸钠水凝胶颗粒。根据文献报道,海藻酸钠水凝胶体系直径大于 0.5 mm 时细胞难以存活^[15],因此,本试验设计的细胞颗粒大小为 0.5 mm \times 0.6 mm \times 0.6 mm。由于细胞颗粒尺寸细小,用模具很难直接成型,本实验中设计了 20 \times 细胞颗粒的细胞微条凹槽,其尺寸为 10 mm \times 0.6 mm \times 0.6 mm,使用时每根细胞水凝胶条再切割成 20 等份,恰好是细胞微粒的大小。每个模具平行排列 25 列细胞微条凹槽,总尺寸 40 mm \times 10 mm \times 2.6 mm,可同时制备 25 根细胞水凝胶微条(图 2A-B)。采用 3D 打印制造的 PLA 阳模(图 2C)表面粗糙而且坚硬,不能直接用于制备细胞水凝胶微条,需要经过琼脂糖翻模制备出琼脂糖阴模(图 2D),再进行翻

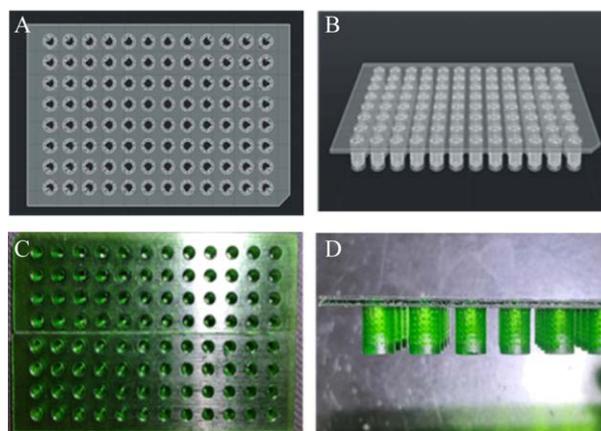


图 1 多孔滤网虚拟模型与实物

Fig. 1 Virtual model and physical object of a porous filter. (A) Computer virtual map (front view). (B) Computer virtual map (oblique view). (C) The actual filter made of photosensitive resin (front view). (D) The actual filter made of photosensitive resin (side view).

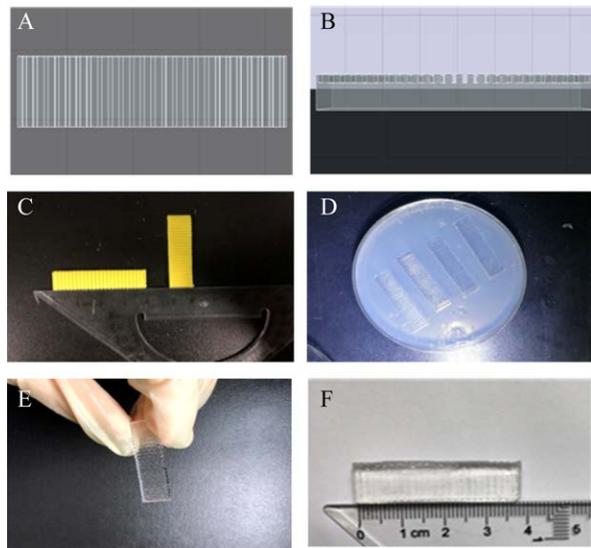


图 2 细胞微粒模具

Fig. 2 The cell particle mold. (A) Computer virtual map (front view). (B) Computer virtual map (side view). (C) PLA positive model. (D) Agarose negative model; (E-F) PDMS mold.

模制造出 PDMS 模具 (图 2E-F)。制成的 PDMS 模具柔软光滑有弹性, 容易脱出细胞水凝胶条, 并且具有良好的细胞相容性, 适合于用于制备细胞水凝胶微条^[16]。

2.2 芯片的装载与运转

使用时首先制备细胞水凝胶条, 将一根凝胶微条切割成的 20 个细胞微粒加入同一个滤网孔中, 这样每孔加入的细胞数是 7×10^6 个 (一根凝胶微条的细胞数), 避免了切割不匀造成的细胞量差异。滤网加好细胞微粒后, 将滤网放进 96 孔细胞培养板, 加入 DMEM/F12 完全培养液即可开始细胞培养, 培养结束后, 只要拿出多孔滤网, 就可以将细胞微粒和培养液完全分开, 方便地进行下一阶段的检测与分析 (图 3A)。

在显微镜下观察培养细胞的生长发育状态。常规培养中, 刚接种的原代胚胎脑细胞为分散分布的圆形细胞, 培养 2-3 d 后, 细胞逐渐生长增殖形成大小不等的团聚体, 这些细胞团聚体结合

松散, 轻轻摇荡就会悬浮、分散 (图 3B)。分散细胞团聚体, 继续培养至第 6-7 天, 细胞发育分化形成树突和轴突, 并开始相互连接, 呈现出典型的神经细胞特征 (图 3C)。在水凝胶颗粒中, 细胞分布于三维空间, 随着细胞的生长增殖, 水凝胶颗粒中的细胞数量越来越多, 在相差显微镜下可见越来越密集的细胞团块 (图 3D)。以 DAPI 对细胞核进行荧光染色, 标示的细胞核呈现出密集的蓝色荧光斑点, 证实胚胎脑细胞在芯片体系中能够很好地生长和增殖 (图 3E)。由于水凝胶颗粒是三维体系, 采用常用显微镜与常规染色方法难以观察到其中的细胞突起和细胞间连接, 我们未能对水凝胶颗粒中的细胞形态进行进一步的观测。

采用定量方法检测芯片体系的细胞生长增殖状态, 向培养液中加入 WST-8, 细胞中的线粒体脱氢酶将其还原成橙黄色的甲臞, 由溶液颜色深浅可探知细胞活力。对常规 2D 培养和水凝胶颗粒 3D 培养细胞的生长曲线进行比较, 两种体系的细胞活力都随着培养时间的延长逐渐增加, 证明胚胎脑细胞在两种体系中均能够生长增殖。但它们的生长特点具有差别, 常规 2D 培养的细胞呈现快速生长-平台-衰退的衍变过程, 培养第 1-4 天细胞活力快速增加, 至第 4 天达到峰值, 此后细胞活力缓慢降低, 而水凝胶 3D 培养的细胞开始时生长增殖较慢, 却能够持续较长时间, 直至培养第 6-7 天仍能够保持细胞活力增高的趋势 (图 4)。

2.3 两种农药对细胞生长增殖的影响

应用上述芯片体系进行农药神经毒性评价。CPF 和 IMI 都是经典的神经毒性杀虫剂, 对哺乳动物神经细胞也有一定的毒性作用^[17-18]。首先研究对神经前体细胞生长增殖的影响, 向培养液中加入不同浓度的 CPF 或 IMI, 孵育 72 h 后观察水凝胶微粒中的细胞核荧光变化。在 CPF 组, 蓝色的 DAPI 荧光强度呈现明显的量效相关的变化,

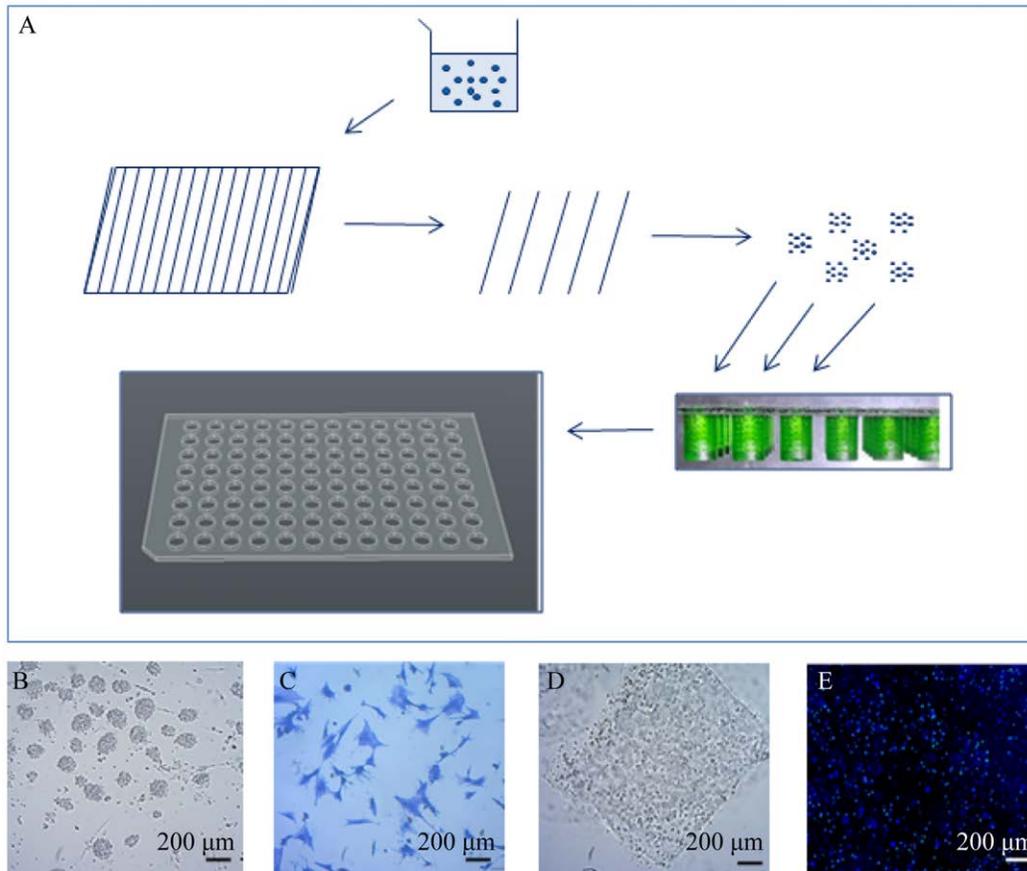


图3 芯片的装载与运转

Fig. 3 Loading and running of the brain-on-chip. (A) Assembly process of the chip. (B) Embryonic brain cells in conventional culture (day 3), the cells formed aggregates of varied size. (C) Embryonic brain cells in conventional primary culture (day 7), stained by coomassie brilliant blue. (D) Embryonic brain cells in hydrogel particle, unstained. (E) Embryonic brain cells in hydrogel particle, stained by DAPI.

以未加入 CPF 即 CPF 浓度为 $0 \mu\text{mol/L}$ 组作为对照, 加入 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 CPF 对 DAPI 荧光强度未产生明显影响, 加入 $30 \mu\text{mol/L}$ 的 CPF 荧光强度开始减弱, 至 $100 \mu\text{mol/L}$ 和 $200 \mu\text{mol/L}$ 时细胞核荧光已很微弱, 说明细胞核数量明显减少, 胚胎脑细胞的生长增殖受到了明显抑制 (图 5A-F)。在 IMI 组, 药物对细胞核荧光的影响较小, 以未加入 IMI 即 CPF 浓度为 $0 \mu\text{mol/L}$ 组作为对照, 自 $10 \mu\text{mol/L}$ 至 $50 \mu\text{mol/L}$ 组的荧光强度未出现明显变化, 直到 $100 \mu\text{mol/L}$ 和 $200 \mu\text{mol/L}$ 浓度的 IMI 暴露, 才出现荧光强度的轻度减弱, 说明胚胎脑细胞的生长增殖仅受到了轻度的抑制作用 (图 5G-L)。

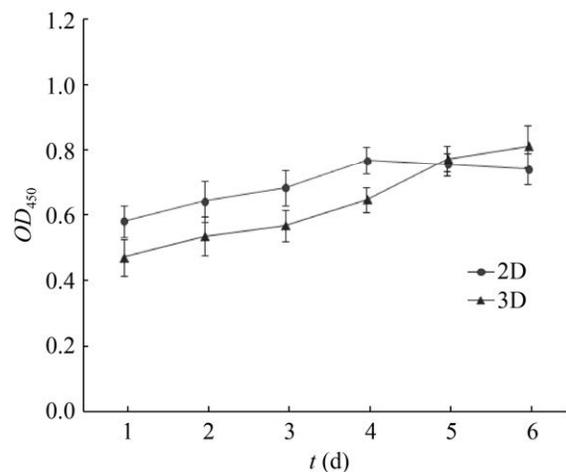


图4 二维与三维体系中的细胞生长曲线

Fig. 4 The cell growth curves in 2D and 3D systems.

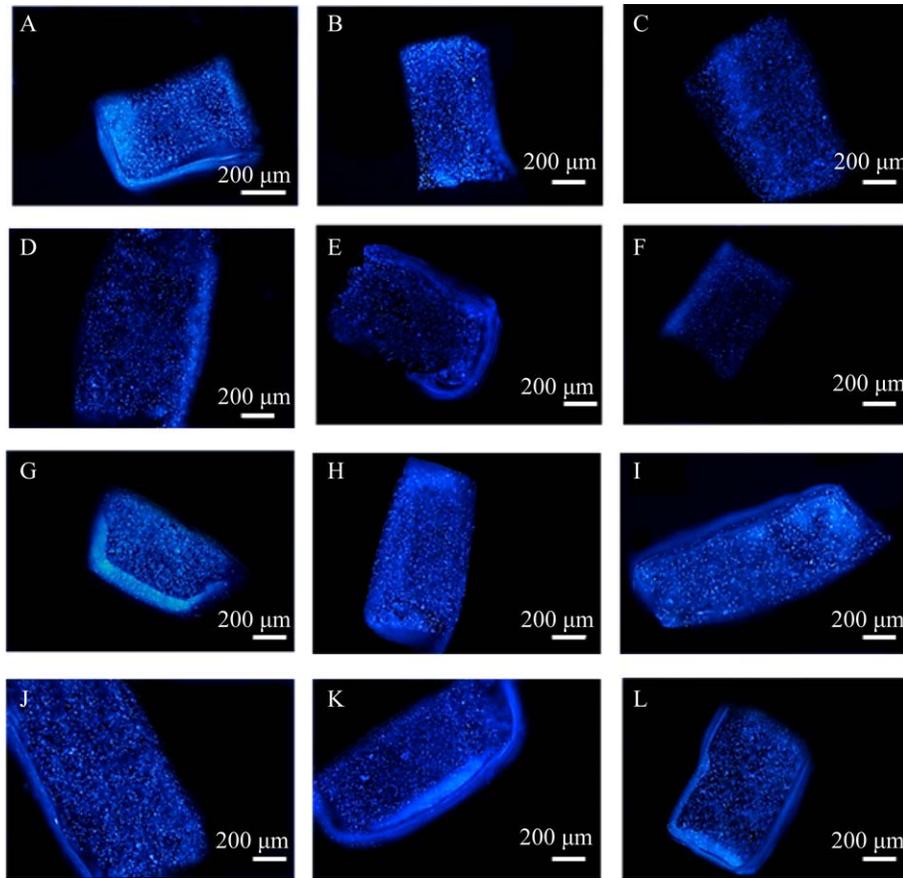


图 5 两种农药对水凝胶微粒体系中细胞核荧光的影响 (72 h)

Fig. 5 Effects of two pesticides on nuclei fluorescent in hydrogel microparticle system (72 h). (A) 0 $\mu\text{mol/L}$ -CPF. (B) 10 $\mu\text{mol/L}$ -CPF. (C) 30 $\mu\text{mol/L}$ -CPF. (D) 50 $\mu\text{mol/L}$ -CPF. (E) 100 $\mu\text{mol/L}$ -CPF. (F) 200 $\mu\text{mol/L}$ -CPF. (G) 0 $\mu\text{mol/L}$ -IMI. (H) 10 $\mu\text{mol/L}$ -IMI. (I) 30 $\mu\text{mol/L}$ -IMI. (J) 50 $\mu\text{mol/L}$ -IMI. (K) 100 $\mu\text{mol/L}$ -IMI. (L) 200 $\mu\text{mol/L}$ -IMI.

采用WST-8法对农药作用下胚胎脑细胞的生长增殖状态进行定量分析,农药暴露72 h后,CPF对细胞增殖呈现明显的抑制作用,10、30、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ CPF组的细胞活力分别下降至对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)的85%、61%、53.9%、42%、19%,毒性作用呈现明显的量效关系(图6A)。而IMI对胚胎脑细胞生长增殖的抑制作用较为和缓,相同剂量处理后的细胞活力下降为对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)的91%、86%、82%、78%、73%,明显弱于CPF的毒性作用(图6B)。

2.4 两种农药对细胞酶代谢的影响

进一步检测农药对细胞酶代谢的影响,作为神经毒性杀虫剂的经典靶标,乙酰胆碱酯酶活力

抑制是农药毒性评价的重要指标^[19]。以0、10、30、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ CPF 孵育水凝胶胚胎脑细胞微粒,24 h后AChE活力分别降至对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)的92%、79%、63%、56%、36%(图7A),而采用同样剂量的IMI暴露,24 h后AChE活力分别降至对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)的90%、83%、74%、69%、67%(图7B)。两种农药都表现出了量效对应的AChE活力抑制,相对来说,CPF的酶抑制毒性比较明显,而IMI的酶抑制毒性比较和缓。

LDH释放是细胞毒性的另一个常用指标,当细胞损伤坏死时,细胞内的LDH释放到细胞外,造成培养液中LDH活性增高^[20]。如图7C所示,以0、10、30、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ CPF 孵育水

凝胶细胞颗粒 24 h, 培养液中的 LDH 相对释放量较对照组分别增加 4%、6%、10%、14% 和 23%, 其中, 10、30 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组相比差异具有显著意义 ($P<0.05$), 而 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 处理

组差异具有非常显著意义 ($P<0.01$)。在同样剂量的 IMI 暴露下, LDH 相对释放量较对照组分别增加 3%、3%、5%、6%、9%, 其毒性作用不如 CPF 明显 (图 7D)。

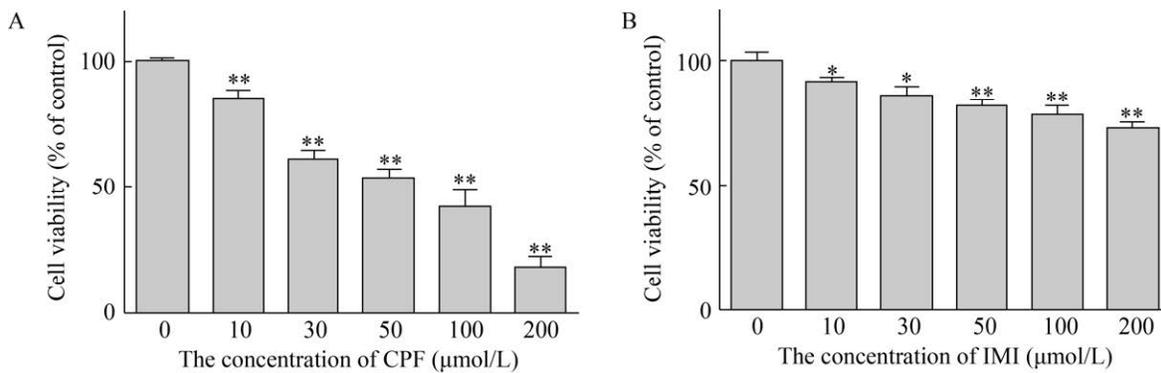


图 6 两种农药对水凝胶微粒体系中胚胎脑细胞增殖的影响 (72 h)

Fig. 6 Effects of two pesticides on proliferation of embryonic brain cells in hydrogel microparticle system (72 h). (A) CPF. (B) IMI.

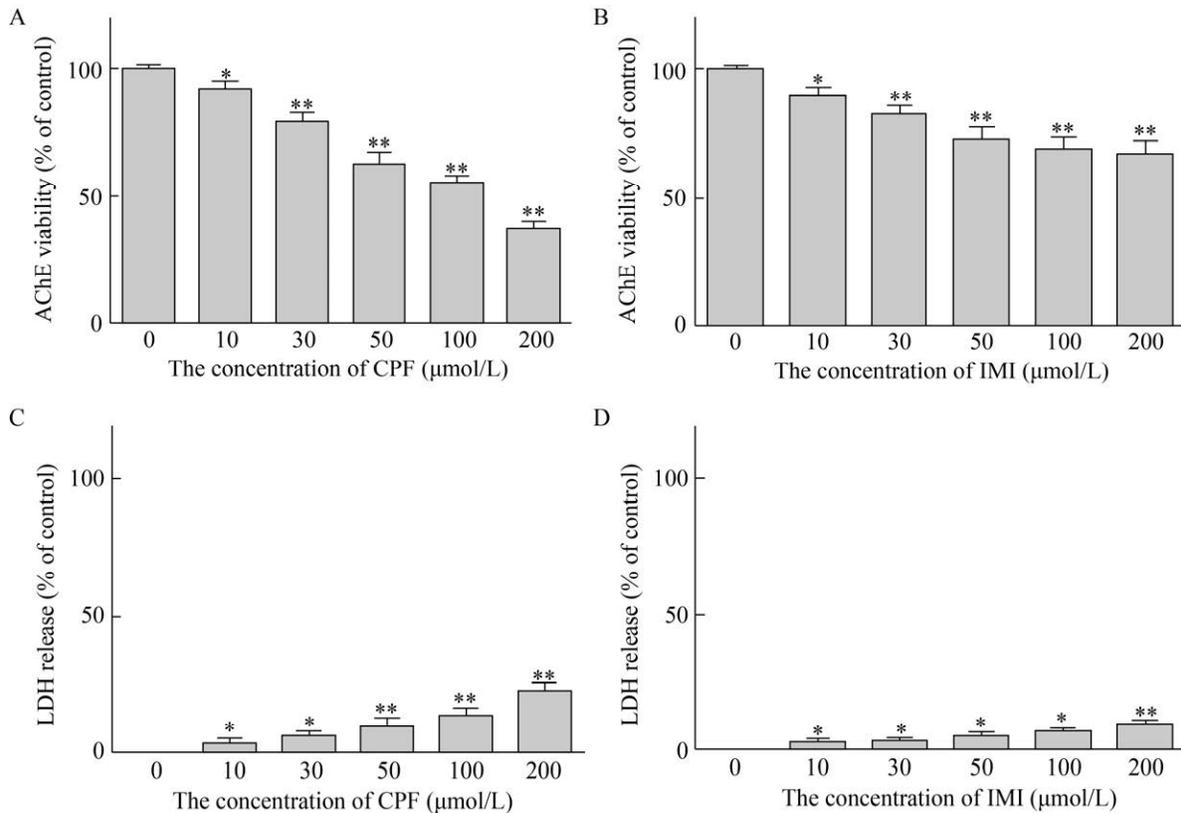


图 7 两种农药对水凝胶微粒体系代谢酶活性的影响 (24 h)

Fig. 7 Effects of two pesticides on metabolic enzymes activity in hydrogel microparticle system (24 h). (A) AChE-CPF. (B) AChE-IMI. (C) LDH release-CPF. (D) LDH release-IMI.

3 讨论

本文研制了一种新型的三维脑细胞芯片。首先使用 AutoCAD 软件和 3D 打印技术设计制备出细胞微粒模具和多孔滤网,然后用细胞微粒模具制备出三维水凝胶脑细胞微粒,将细胞微粒放入多孔滤网,再装载到 96 孔细胞培养板,加入培养液或含不同浓度农药的孵育液,脑神经细胞在三维水凝胶体系中生长。培养结束后移去滤网,就可以将细胞与培养液分离,从移去细胞的 96 孔培养板中吸取培养液,或向培养液中加入检测试剂,可以方便地进行细胞生长增殖以及代谢的检测。

在本文研制的芯片体系中,海藻酸钠水凝胶构成了脑神经细胞生长增殖的友好环境,促进了神经细胞的良好生长,因而,水凝胶构成的 3D 体系中细胞能够较为持久地保持生长增殖状态^[21]。另一方面,与常规细胞培养中的平面生长相比,三维生长的细胞水凝胶颗粒更加接近体内组织结构,在疾病机制和药理毒理研究中能更逼真地反映体内的代谢变化^[22]。而多孔滤网的设计为细胞与培养液快速分离提供了极大的方便,有利于开展高通量检测。

应用该芯片进行 CPF 和 IMI 两种农药的神经毒性检测,发现均能抑制胚胎脑细胞的生长增殖,在 10、30、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下,胚胎脑细胞的细胞活力和细胞核荧光强度随药物浓度的增加而逐渐减弱,CPF 的毒性作用明显强于 IMI。对农药神经毒特异性靶标 AChE 活力的检测结果表明,CPF 对 AChE 活力具有明显的抑制作用,可造成重度酶活力抑制(36%活力,200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度),而 IMI 仅造成了轻中度的酶活力抑制(67%,200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度)。进一步对细胞损伤标志 LDH 释放的检测结果表明,CPF 和 IMI 都能损伤细胞,造成培养液中 LDH 外溢,这种毒性作用呈现量效关系,在 50–200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度表现明显,CPF 造成的毒性作用是 IMI 的 2.0–2.5 倍。

本文研制的新型三维脑细胞芯片可用于脑疾病机制以及神经毒理药理研究,其使用方便,检测快速,细胞呈三维生长,更能体现组织中复杂的细胞间相互作用。

REFERENCES

- [1] McWhirter L, Ritchie C, Stone J, et al. Functional cognitive disorders: a systematic review. *Lancet Psychiatry*, 2020, 7(2): 191-207.
- [2] Dimitrova-Shumkovska J, Krstanoski L, Veenman L. Diagnostic and therapeutic potential of TSPO studies regarding neurodegenerative diseases, psychiatric disorders, alcohol use disorders, traumatic brain injury, and stroke: An update. *Cells*, 2020, 9(4): 870.
- [3] Paridaen JTML, Huttner WB. Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep*, 2014, 15(4): 351-364.
- [4] Tomooka Y, Kitani H, Jing N, et al. Reconstruction of neural tube-like structures *in vitro* from primary neural precursor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(20): 9683-9687.
- [5] Gu Q, Tomaskovic-Crook E, Lozano R, et al. Functional 3D neural mini-tissues from printed gel-based bioink and human neural stem cells. *Adv Healthc Mater*, 2016, 5(12): 1429-1438.
- [6] Mobini S, Song YH, McCrary MW, et al. Advances in *ex vivo* models and lab-on-a-chip devices for neural tissue engineering. *Biomaterials*, 2019, 198: 146-166.
- [7] Park JS, Lee BK, Jeong GS, et al. Three-dimensional brain-on-a-chip with an interstitial level of flow and its application as an *in vitro* model of Alzheimer's disease. *Lab Chip*, 2015, 15(1): 141-150.
- [8] Wang YI, Abaci HE, Shuler ML. Microfluidic blood-brain barrier model provides *in vivo*-like barrier properties for drug permeability screening. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(1): 184-194.
- [9] Lee DH, Bae CY, Kwon S, et al. User-friendly 3D bioassays with cell-containing hydrogel modules: narrowing the gap between microfluidic bioassays and clinical end-users' needs. *Lab Chip*, 2015,

- 15(11): 2379-2387.
- [10] Azari H, Sharififar S, Rahman M, et al. Establishing embryonic mouse neural stem cell culture using the neurosphere assay. *J Vis Exp*, 2011, (47): 2457, doi: 10.3791/2457.
- [11] Azari H, Reynolds BA. *In vitro* models for neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(6): a021279.
- [12] Skandrani D, Gaubin Y, Beau B, et al. Effect of selected insecticides on growth rate and stress protein expression in cultured human A549 and SH-SY5Y cells. *Toxicol in Vitro*, 2006, 20(8): 1378-1386.
- [13] Li SJ, Chen P, Peres TV, et al. Triclosan induces PC12 cells injury is accompanied by inhibition of AKT/mTOR and activation of p38 pathway. *Neurotoxicology*, 2019, 74: 221-229.
- [14] Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 1961, 7(2): 88-95.
- [15] Decher G, Hong JD, Schmitt J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films*, 1992, 210-211: 831-835.
- [16] McDonald JC, Whitesides GM. Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Acc Chem Res*, 2002, 35(7): 491-499.
- [17] Rush T, Liu XQ, Hjelmhaug J, et al. Mechanisms of chlorpyrifos and diazinon induced neurotoxicity in cortical culture. *Neuroscience*, 2010, 166(3): 899-906.
- [18] David D, George IA, Peter JV. Toxicology of the newer neonicotinoid insecticides: imidacloprid poisoning in a human. *Clin Toxicol (Phila)*, 2007, 45(5): 485-486.
- [19] Del Pino J, Moyano P, Anadon MJ, et al. Acute and long-term exposure to chlorpyrifos induces cell death of basal forebrain cholinergic neurons through AChE variants alteration. *Toxicology*, 2015, 336: 1-9.
- [20] Elmazoglu Z, Saglam ASY, Sonmez C, et al. Luteolin protects microglia against rotenone-induced toxicity in a hormetic manner through targeting oxidative stress response, genes associated with Parkinson's disease and inflammatory pathways. *Drug Chem Toxicol*, 2020, 43(1): 96-103.
- [21] Frampton JP, Hynd MR, Shuler ML, et al. Fabrication and optimization of alginate hydrogel constructs for use in 3D neural cell culture. *Biomed Mater*, 2011, 6(1): 015002.
- [22] Koo Y, Hawkins BT, Yun Y. Three-dimensional (3D) tetra-culture brain on chip platform for organophosphate toxicity screening. *Sci Rep*, 2018, 8: 2841.

(本文责编 郝丽芳)