

硅微通道内血细胞流动特性测试

王小章, 王朝晖, 蒋庄德, 叶鹏

(西安交通大学机械制造系统工程国家重点实验室, 710049, 西安)

摘要: 在微型机电系统硅微制造技术制作的矩形硅微通道内注入血细胞溶液, 用高速摄影机采集记录血细胞微流动图像, 利用图像处理技术, 对流动图像进行背景噪声滤除、对比度增强、平滑滤波、形态学运算等操作, 并用提取的边缘进行图像分割及识别. 按照目标识别的结果, 对识别出的细胞形状通过曲线拟合法进行修正, 计算出多个流动状态参数, 如细胞大小、流动速度等. 计算结果表明: 微通道内细胞的流动速度仍近似地符合抛物线形分布, 与宏观流动的流形相类似; 在流体溶液的作用下, 血细胞的流动状态不仅伸长变形成椭球形, 而且还会产生翻滚和旋转的运动方式, 并发生在细胞各自的移动路径中, 使得细胞在流体中的姿态不断发生变化; 细胞的翻滚和旋转产生的原因主要是血细胞自身形状所受的流动剪切力矩不平衡, 而运动的结果使血细胞的流动行为更加复杂多变.

关键词: 微型机电系统; 微流动; 微通道; 血细胞流动特性

中图分类号: R318.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-987X(2009)05-0128-05

Flow Characteristics of Blood Cells in Silicon Microchannel

WANG Xiaozhang, WANG Chaohui, JIANG Zhuangde, YE Peng

(State Key Laboratory for Manufacturing Systems Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract: The diluted blood cell solution was injected into microfabricated silicon microchannels, and a high speed complementary metal oxide semiconductor camera was employed to record the microflow video. The images extracted from the recorded video were processed and segmented with background noises removing, contrast gradient enhancing, intensity smoothing, and mathematical morphology operating to recognize the moving objects. For the errors and deviations in segmentation, the recognized cell shapes were corrected to more reasonable profiles by curve-fitting, and applied to calculate the flow parameters of cells including sizes, velocities etc. The calculated results indicated that the flow profile of cells gets approximately parabolic and similar to the common flow in large channels. Under the pulling and dragging of solution, cells not only are elongated to ellipsoidal shapes but also roll and rotate themselves to adjust orientation in fluid environment. These rolling and rotating movements only occur in their flow traces and change their flow state in microchannels. The reason why these phenomena take place is mainly due to the imbalance of the flow shear torques upon blood cell in the microchannel, which makes the flow characteristics of blood cells more complicated and variable.

Keywords: micro electromechanical system; microfluid; microchannel; blood cell flow characteristics

微流体技术以其固有的特点和优势, 在多个领域内获得了广泛的应用, 如芯片散热、生化分析、微

量检测、疾病诊断等. 特别是应用于生物细胞操作时,不仅可以进行细胞种类识别、分离、破裂,以及细胞各种属性的测定,而且还可以通过流体驱动和控制,研究细胞在不同条件下的微流动特性. 细胞流动特性属于细胞流变学研究范畴,它涉及到流体力学、流变学、细胞生物物理学、细胞生化学等多种学科领域,采用的研究方法和技术包括流体驱动与控制、显微成像检测、图像处理、计算机控制、精密制造技术等^[1-3]. 研究细胞的流变性不仅可以认识细胞的组织结构以及力学、生物、化学特性,而且还可以为临床诊断和治疗提供直接的诊疗依据. 目前,国外已有利用细胞流变性来诊断贫血、疟疾、糖尿病等的相关报道^[4-6].

现有的血细胞变形研究大多采用红细胞悬浮液的小尺度流动和基于微孔过滤的统计计算方法来进行^[3],而忽略了血液流动中多种细胞间的相互作用及各自的特殊流动特性. 本文利用矩形硅微通道来模拟毛细管道并测试血细胞的流动特性,以全血细胞溶液作为流动对象,研究压力注入方式下细胞在微米级通道内的多种流动特性,利用数字图像处理技术来识别和计算细胞的流动状态,并按照识别的细胞形态,对细胞的微流动特性进行相应的分析和讨论.

1 微流动实验系统及设备

微流动实验系统基本上由3个子系统组成,即流体驱动与控制系统、运动图像成像采集系统及图像数据处理系统^[7],如图1所示.

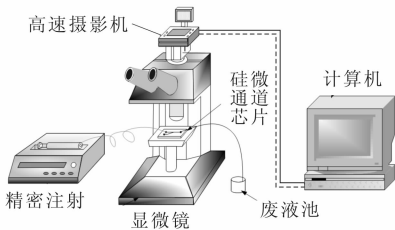


图1 微流体实验观测及图像采集系统

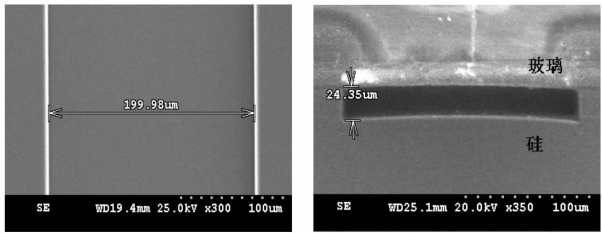
1.1 流体控制及图像采集

由于流动控制的稳定性和可靠性对细胞运动状态影响很大,因此选用压力注入方式. 精密注射泵(ALC-IP800,上海奥尔科特生物科技有限公司)使用常规的20 mL医用注射器,可以实现0.002~550 mL/h的可调速度注射,显微放大系统(MA2001,重庆光学仪器公司)可以实现100~1 000的放大倍率

和1 μm 的分辨能力,高速摄像机(TroubleShooter,美国DRC公司)以1 000 帧/s的速率进行640 $\times$ 480 像素的图像拍摄,并通过USB接口输入到计算机中存储.

1.2 硅微通道芯片的制作

硅微通道芯片采用标准的硅微制造工艺制作^[8]. 单晶硅片经过清洗、光刻、ICP(Ion Coupled Plasma)刻蚀和清洗,来完成微通道的加工. 清洗后的硅片与已加工好连接孔的玻璃片(Prex 7740)经阳极键合实现微通道的封闭. 最后,在玻璃的连接孔上安装进、出接口管,用环氧树脂实现接口管同玻璃之间的粘结,从而保证了连接的强度和密封性. 对制作完成后的微芯片,采用去离子水注入来检查加工质量及微通道的密封效果,以防止阻塞及各种连接不良造成的泄漏,所制作的硅微通道为30 000 μm $\times$ 200 μm $\times$ 25 μm 的矩形结构,硅微通道的SEM照片如图2所示.



(a)矩形微通道 (b)微通道截面

图2 硅微通道的SEM照片

2 实验过程

2.1 样品准备

抽取健康男子的静脉全血,并按照每mL血加入10 U肝素抗凝剂的比例,加入抗凝剂溶液,然后将抗凝后的血液使用PBS缓冲溶液($c(\text{NaCl})=0.12\text{ mol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{HPO}_4)=0.02\text{ mol/L}$, $c(\text{KH}_2\text{PO}_2)=0.05\text{ mol/L}$, $\text{pH}=7.4$,渗透压为0.29 Osm/kg)稀释后备用. 由于血细胞的生物活性容易受到多种环境因素的影响,如温度、保存时间等,因此实验中的细胞溶液需要做到即采即用,并且全部实验应在6 h内完成,以防止细胞活性发生改变^[2-3].

2.2 硅微通道清洗及血细胞样品注入

对制作好的硅微通道,清洗工作不仅包括对矩形结构的清洗,而且要采用预涂覆技术来改变通道四壁的表面特性,以减少血细胞在上面的粘附^[2]. 首先,用70%的酒精溶液注入冲刷,以便清洗掉通道

壁上的一些可能的有机污染物,然后用去离子水连续冲洗通道 1~2 h,最后将 PBS 缓冲液加 1% 的白蛋白溶液注入微通道并浸泡 30 min,涂覆管道壁以减少血细胞的粘附.

浸泡预处理完成后,将稀释好的血样用精密注射泵按设定的速度注入,同时调整显微镜观测流动图像,等待流动稳定后开始拍摄流动图像.由于压力控制的滞后性,每次更改注入参数后都应等待 10~20 min,待流动状态稳定后再开始记录.对每组流动参数应重复多次测试和记录,以消除偶然因素对细胞流动状态的影响.

3 实验结果分析及讨论

血液是包含多种组分的混合悬浮液,其中的红细胞体积约占 40%~50%,其数量和变形能力远远大于白细胞和血小板,因此这里的流动特性只讨论红细胞在流动图像中的识别及流动姿态的计算.

3.1 微流动图像的处理及识别

与通常的染色、涂色片的显微图像相比,细胞流动图像有着更强的背景噪声,大量的图像细节都淹没在背景噪声中(见图 3a),造成图像对比度较低,因此难于分割和识别.其中的原因为:①由于高速率采集造成 CMOS 靶面上图像的照度不高,使图像整体亮度不高,因此严重影响了图像的对比度和细节的表现;②在图像采集过程中噪声源较多,除了常见的多种图像采集中的干扰噪声外,还存在着成像系统背景噪声及细胞离焦模糊的现象.

由于流动图像的高噪声特点,因此在处理分析时,需要采取去背景、图像增强、形态学运算分割的步骤进行^[9-10].图 3 给出的是图像处理过程和识别的结果,从图中可以看出,原始图像的背景噪声经过去除后强度减弱,对比度增强后可将运动细胞对象清晰地显示出来.增强后的图像再经过相应的平滑滤波和边缘提取后,就得到各个细胞的边缘图像(见图 3c),基本上可将运动目标识别出来.图 3d 给出的则是识别出的细胞边缘与原始图像的叠加结果,

可以看出二者较好地吻合在一起.

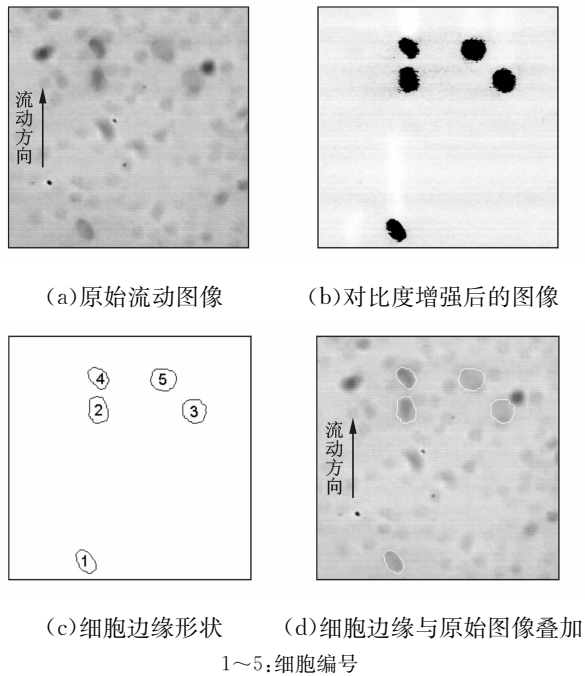


图 3 微流动图像的处理过程及识别结果

由于图像处理的离散化运算及误差,识别出的细胞形状不再表现为椭圆形,因此需要对其外形进行一定的修正计算(见图 4).应用最小二乘法对识别出的细胞形状进行插值拟合,表 1 给出了全部 5 个细胞的识别和修正计算结果,表中的面积、周长、中心位置为直接识别结果,长短轴、方位角为修正后的计算结果.方位角表示细胞变形后长轴与水平右方向的夹角,采用表 1 中的几个参数基本上就可以描述细胞在图像中的运动姿态.在标定了流动图像的实际放大倍率后,即可计算出每个识别对象的实际大小.

3.2 细胞流动速度分布

血细胞在周围溶液的拖曳作用下运动,因此细胞的运动速度也能体现出微通道内流体的速度分布.根据不同时刻图像上细胞位置的移动距离 ΔL 以及图像记录的时间间隔 Δt ,就可以计算出细胞的

表 1 识别及计算出的细胞状态参数

编号	面积/像素	周长/像素	中心坐标/像素	长轴/像素	短轴/像素	方位角/(°)
1	509	74	(96.5,278.5)	16.2	10.2	126.7
2	578	88	(112.0,103.5)	16.6	10.9	100.5
3	639	90	(231.5,162.0)	15.5	13.6	138.1
4	443	73	(112.0,82.0)	14.4	10.1	128.5
5	691	88	(193.0,122.0)	15.2	15.2	90.0

流动速度 $v=\Delta L/\Delta t$. 图 5 给出了采用多幅图像计算出的细胞中心移动速度,并采用数据拟合算法计算出矩形通道内的流动速度分布,图中的横轴表示细胞在流动图像中的像素坐标,纵轴表示的是计算出的移动速度. 图 5 中的速度分布曲线显示,在不考虑细胞与溶液间的相对滑动的条件下,微流动的速度分布仍符合普通压力流动的抛物线流形. 在通道中心($x\approx 435$ 像素处)的流动速度最快,并逐渐向两边减小.

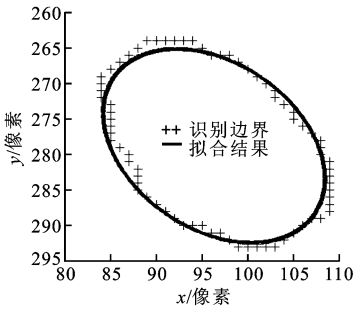


图 4 1 号细胞的外形修正结果

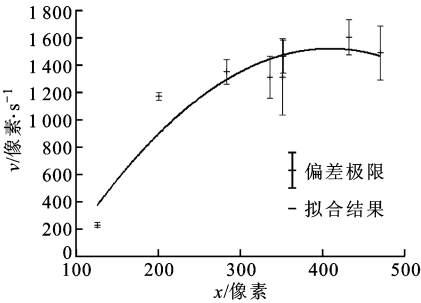


图 5 微通道内细胞移动速度的分布

3.3 细胞的翻滚和旋转

按照微流体理论,微尺度下的流动属于层流动,因而细胞在溶液作用下应沿流动方向移动并产生一定的变形,但实验记录的流动图像却显示出了一些细胞的翻滚和旋转运动过程. 图 6 给出的是 4 个不同时刻 2 个细胞的原始图像及各个时刻的叠加结果. 从图中可以看出,2 个细胞在 0.065 s 内发生了一次完整的翻滚和旋转过程,分别在垂直面和水平面内完成了翻滚和旋转过程. 图 6a 中方框内右上角为一个细胞图像,表现为长轴向左倾斜的椭圆形,并在图 6b 中发生一定的翻滚,投影面积变小,脱离焦平面而使图像模糊. 在图 6c 中,该细胞大致恢复到图 6a 中的状态,但倾斜角度明显较小. 在图 6d 中细胞有一定旋转,椭圆长轴朝向流动方向,左下角的细胞则在图 6b~图 6d 中有一个翻滚的过程,2 个细胞的翻滚方向正好相反,左下细胞向左上方向滚动,右

上细胞则朝右上方向滚动. 从图 6 的观测分析中可以看出,此细胞为一双凹饼状的红细胞,正是其饼状结构的翻滚运动,产生了图像中细胞外形不断变化的现象. 图 6e 给出的是 2 个细胞边缘形状在不同时刻的叠加图像,从中可以清晰地看出细胞的运动路径和过程,2 个细胞在各自的流动路径内发生翻滚和旋转,并且没有改变自身的流动路线.

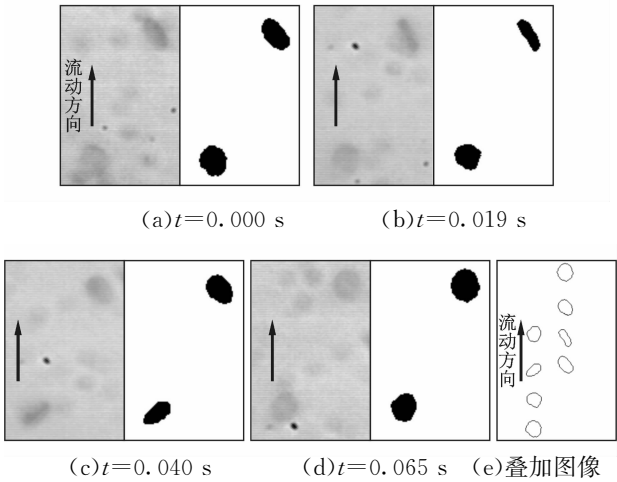


图 6 细胞的翻滚和旋转图像

由于所有流动图像全部采集于微通道中的稳定流动状态,因此不存在流动的展开或不稳定的因素. 由此推测,细胞的翻滚和旋转可能与矩形微通道内流动剪应力不均匀有关,当细胞上下表面上的剪应力不平衡时就会产生一个翻滚的力矩,而旋转则是左右两边的拖曳力矩不平衡所致. 血细胞形态的这种改变使得流动现象更加复杂,但这种改变的原因和发展机理仍需要进一步观测和研究.

4 结 论

在微尺度通道内的血液流动中,血细胞的运动状态和变形能力起到相当大的主导作用,直接影响着血液的整体流变特性. 本文研究了血细胞微流动的特性,不仅对于认识和理解微管道血液流变特性、微循环运行机理、血细胞的组织构成及力学性能都有积极意义,而且还可以应用于临床的疾病诊疗中. 本文利用数字图像处理与识别技术,对稀释的血细胞溶液微流动图像进行处理和识别计算,经过图像增强和形态学分割,识别并计算出血细胞微流动中的运动状态,并对细胞运动状态进行了跟踪尝试. 结果表明:压力驱动微流动中的血细胞移动速度基本符合抛物线流形,即速度的大小从通道中心向两边逐渐减小;血细胞的流动状态不仅产生伸长变形,而

且还会产生翻滚和旋转的运动方式,但翻滚和旋转只发生在自身的移动迹线中,因此改变了它在流体中的悬浮姿态. 血细胞的这些运动方式,使得微尺度下的血液细胞溶液流动变得更加复杂和多变.

参考文献:

- [1] TONER M, IRIMIA D. Blood-on-a-chip [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2005(7): 77-103.
- [2] BRANSKY A, KORIN N, NEMIROVSKI Y, et al. Correlation between erythrocytes deformability and size: a study using a microchannel based cell analyzer [J]. *Microvascular Research*, 2007, 73(1): 7-13.
- [3] 姜海, 郑小林, 彭承琳, 等. 基于 MEMS 技术的红细胞变形性测量系统的研究 [J]. *中国医疗器械信息*, 2006, 12(12): 28-38.
JIANG Hai, ZHENG Xiaolin, PENG Chenglin, et al. System for measuring red blood cell deformability based on MEMS [J]. *China Medical Device Information*, 2006, 12(12): 28-38.
- [4] JEONG J H, SUGII Y, MANAMIYAMA M, et al. Measurement of RBC deformation and velocity in capillaries in vivo [J]. *Microvascular Research*, 2006, 71(3): 212-217.
- [5] SHELBY J P, WHITE J, GANESAN K, et al. A microfluidic model for single-cell capillary obstruction by plasmodium falciparum-infected erythrocytes [J]. *PNAS*, 2003, 100(25): 14618-14622.
- [6] VAN VLIET K J, BAO G, SRUESH S. The biomechanics toolbox: experimental approaches for living cells and biomolecular [J]. *Acta Materialia*, 2003, 51(19): 5881-5905.
- [7] WANG Chaohui, WANG Xiaozhang, YE Peng. The transport and deformation of blood cells in microchannel [C] // 3rd IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems. New York, USA: IEEE, 2008: 116-119.
- [8] NGUYEN N T, WERELEY S T. Fundamentals and applications of microfluidics [M]. Boston, USA: Artech House, 2003: 27-45.
- [9] 阮秋琦. 数字图像处理学 [M]. 北京: 电子工业出版社, 2001: 241-280.
- [10] 孙兆林. MATLAB6. X 图像处理 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2002: 181-206.

(编辑 管咏梅)