

無鏡頭CMOS感測器於細胞生長監控之研究

張格東 副教授

國立屏東科技大學生物科技系 | 聯絡電話：08-7703202分機6362

E-mail: kotunge@mail.npust.edu.tw

王耀男 副教授

國立屏東科技大學車輛工程系 | 聯絡電話：08-7703202分機7456

E-mail: yanwang@mail.npust.edu.tw

(一)源起

近年微機電系統技術的進步下已開發出許多微流體設備，包含了微混合器 (micromixer)、微晶片電泳 (electrophoresis microchip)、光學微流式細胞儀 (optical microflow cytometer)、庫氏計數器 (coulter counters)、微型泵浦 (micropumps)、細胞培養晶片 (cell culture chips)、光流體顯微鏡 (optofluidic microscopes)。在2012年已開發出微流體之平台可用來長時間(72小時)動態監測小鼠CD4⁺T細胞且能夠觀察到個別的CD4⁺T細胞分化與細胞死亡明確的時間¹。此外許多研究表示此電極阻抗監控器對於細胞增生和細胞毒性測試有一定的可行性，並開發出單細胞電極阻抗感測器用以探討不同濃度之細胞毒性藥物對於T89G細胞增生速率的影響²。

然而無鏡頭CMOS光感應晶片與傳統顯微鏡所用的CCD感光元件成本來的低，體積小、重量輕。許多文獻提出利用CMOS影像系統即時監控細胞生長，例如：利用小型顯微鏡系統結合了網路攝影機 (webcam) CMOS模組與LED光源監控小鼠纖維母細胞 (fibroblast) 之生長情形³。利用高解析度之CMOS感光元件顯微鏡、23 LED、彩色濾光片 (color filter) 來偵測受癌原蟲感染的紅血球細胞⁴。此外用來進行化學檢測、細胞分選與計數、細胞培養的3D微流體晶片普遍是由具有低成本、可加工特性、高光學透光度之PDMS (polydimethylsiloxane) 或 PMMA (polymethyl methacrylate) 材質製造而成⁵⁻¹²。

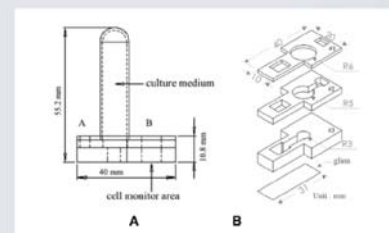
(二)設計概念

本研究利用無鏡頭CMOS光感應晶片開發一個平台，可用來即時監控細胞生長。該平台的主要構成包括低成本CO₂雷射剝蝕技術製成之PMMA細胞培養晶片與多通道無鏡頭之CMOS光感應晶片/ LED影像系統。為了確認此平台在細胞實驗上之可行性，將此儀器光源與CMOS設定每30分鐘短暫開啟，影像拍攝視野約2.0mm×3.5mm，解析度為2.1×10⁶，拍攝後關閉。接著進行①細胞增生實驗：使用HepG2肝癌細胞培養於PMMA (Polymethyl Methacrylate) 細胞培養晶片48小時並利用LabVIEW程式中Vision系統做影像處理與數據分析來計數每小時之細胞數量，並利用公式： $\log_2(\text{pixel number})_h / (\text{pixel number})_{h-1}$ 算出細胞倍增時間。②細胞毒性測試：培養HepG2肝癌細胞分別加入8、16、32mM之環磷酰胺(cyclophosphamide)進行實驗。

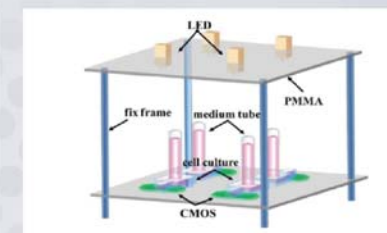
(三)技術開發

細胞培養微晶片分別由三層PMMA (Polymethyl Methacrylate) 材質，厚度各為1.6、3.2、6mm疊放在尺寸為24 mm×60mm×150 mm之玻璃板上所構成 (圖一)。PMMA細胞培養晶片上層有半徑為6mm環形孔徑能夠放置細胞培養液管，2個矩形孔洞用來平衡大氣壓力使細胞生長區保有培養液，供細胞生長 (圖一，

B,#1)。中層孔徑小於上層因此能支持細胞培養液管裝置於微晶片上 (圖一，B，#2)。最底層則含有半徑3mm環形培養液槽與8 mm×6mm矩形大小之細胞培養區 (圖一，B，#3)。接著透過LabVIEW程式中Vision系統來建構影像處理與軟體分析、操控多通道無鏡頭之CMOS影像系統。整體尺寸僅為130×104×115mm³，具有4個CMOS影像感測器與4個LED自然光源。因此可被放置在市售細胞培養箱 (圖二) 長時間觀察細胞生長情況之監測系統。



圖一
(A) 3D PMMA 細胞培養微晶片的架構
(B) 微晶片各別單獨組成的架構。



圖二
細胞培養與監測平台的架構

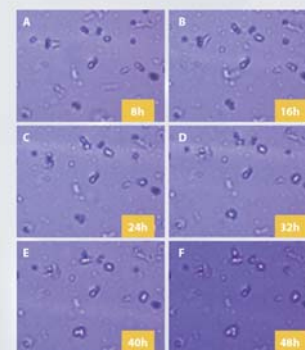
(四)技術競爭力

無鏡頭CMOS光感應晶片與傳統顯微鏡所用的CCD感光元件成本來的低，體積小、重量輕，我們在實際細胞培養的利用上可以獲得清晰的影像，並可以準確計算出細胞生長的速率，在藥物毒理測試上也可以即時觀測得到藥物作用在細胞上的時間點，相較於市面上動輒數十萬到數百萬的儀器，該設備之準確程度毫不遜色。

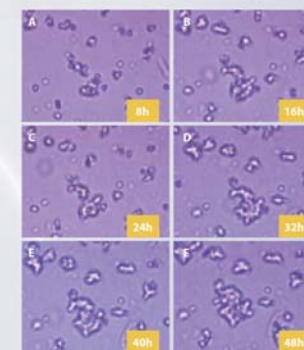
(五)研發成果

1.細胞增生實驗

在HepG2肝癌細胞增生試驗連續觀察細胞生長48小時，圖三、圖四分別為HepG2肝癌細胞在高或低起始濃度培養下，於無鏡頭之CMOS以每8小時間隔所拍攝影像。

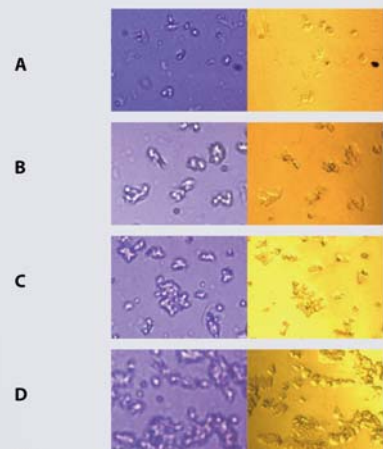


圖三
HepG2肝癌細胞起始濃度5000 cells / mL在 (A) 8 (B) 16 (C) 24 (D) 32 (E) 40 (F) 48小時下之細胞增生CMOS影像圖



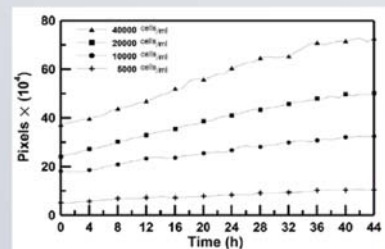
圖四
HepG2肝癌細胞起始濃度20000 cells / mL在 (A) 8 (B) 16 (C) 24 (D) 32 (E) 40 (F) 48小時下之細胞增生CMOS影像圖

圖五為比較CMOS影像系統(左)與傳統顯微鏡倍率40x(右)在HepG2肝癌細胞於不同起始濃度培養48小時之影像圖，得知此影像系統與傳統顯微鏡並無差異，證實多通道無鏡頭CMOS / LED影像系統之可行性並推斷出此系統放大倍率約為40x。



圖五
比較CMOS影像系統(左)與傳統顯微鏡(右)倍率40x，HepG2肝癌細胞起始濃度下分別為(A) 5000 cells/mL (B) 10000 cells/mL (C) 20000 cells/mL (D) 40000 cells/mL 在培養48小時後之影像圖

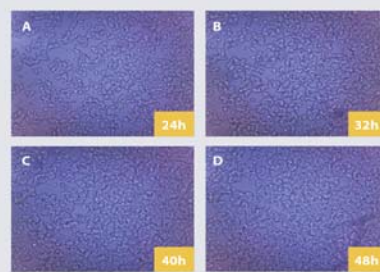
此外藉由LabVIEW程式中Vision系統來進行影像處理與後製分析在不同濃度之HepG2肝癌細胞培養每小時所拍攝之影像，計算出細胞pixel值做出細胞生長速率圖(圖六)與統計出細胞分裂指數(cell division index)分別為50.7、44、51.9、48.8%，細胞倍增時間為43、52.5、41.6、45.4小時，結果顯示培養四種不同濃度之HepG2肝癌細胞，細胞生長速率大致相近。



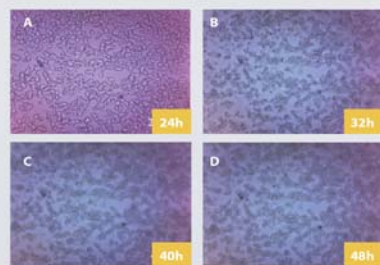
圖六
起始不同濃度之HepG2肝癌細胞生長速率圖

2.細胞毒性實驗

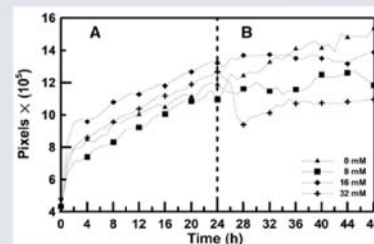
相較於未處理之細胞其生長正常平穩(圖七)，培養HepG2肝癌細胞並處理32mM之環磷酰胺在24、32、40、48小時下，則使細胞增生緩慢導致死亡(圖八)。接著比較HepG2肝癌細胞處理0、8、16、32mM之環磷酰胺對於生長速率的影響(圖九)，結果顯示細胞分裂指數分別為46、34.5、29.1、17.4%，倍增時間為49.6、72、88.5、159.6小時(表一)。代表細胞隨著處理環磷酰胺的濃度提高，細胞倍增時間也相對增加，生長速率明顯變的緩慢。此外在HepG2肝癌細胞處理0、8、16、32mM之環磷酰胺培養24小時後使用傳統顯微鏡拍攝細胞影像能夠看到黑點的存在與處理環磷酰胺會引起細胞死亡的結果對應(圖十)。



圖七
CMOS拍攝未處理環磷酰胺之HepG2肝癌細胞(起始濃度20000 cells/mL)於(A) 24 (B) 32 (C) 40 (D) 48小時生長情形



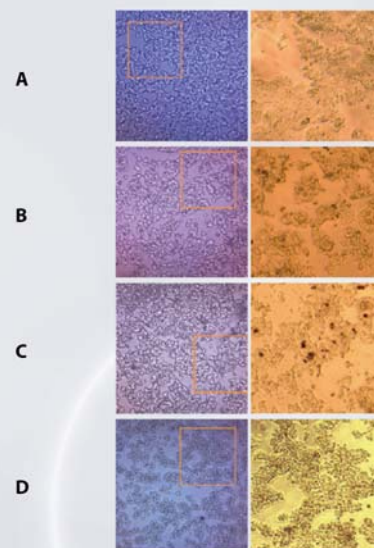
圖八
CMOS拍攝處理環磷酰胺之HepG2肝癌細胞(起始濃度20000cells/mL)於(A) 24 (B) 32 (C) 40 (D) 48小時之生長情形



圖九
HepG2肝癌細胞於(A)正常條件與(B)處理不同濃度環磷酰胺之細胞生長曲線圖

表一
HepG2肝癌細胞在正常與處理環磷酰胺條件下之細胞分裂指數(%)與倍增時間(小時)

Cyclophosphamide concentration (mM)	0	8	16	32
Division index (%)	46.0	34.5	29.1	17.4
Doubling time under normal conditions (hours)	36.9	39.5	44.0	36.5
Doubling time under cyclophosphamide-treated conditions (hours)	49.6	72.0	88.5	159.6



圖十
比較CMOS影像系統(左)與傳統顯微鏡(右)倍率40x，在HepG2肝癌細胞處理環磷酰胺(A)0mM (B) 8 mM (C) 16 mM (D) 32mM 之影像圖

綜觀上述實驗，本研究提出由PMMA細胞培養晶片與CMOS影像系統所構成之低成本平台，可提供細胞即時監控與結果分析。藉由该平台進行長時間(48小時)監控高與低起始濃度之HepG2肝癌細胞，除此之外額外加入不同濃度之環磷酰胺進行細胞毒性測試。結果顯示正常條件下之細胞生長速率為44~52%，細胞平均倍增時間為46小時；處理環磷酰胺細胞生長速率則是17.4 ~ 34.5%，導致細胞倍增時間增加明顯緩慢細胞生長。因此，處理濃度32mM環磷酰胺後細胞倍增時間約為160小時。

最後此無鏡頭之CMOS/LED影像系統所採集之影像品質良好一致，倍率約為傳統顯微鏡的40x，證實此平台能夠長期即時監控細胞之生長情況且相較於傳統顯微鏡要來的成本低、體積小、重量輕，在生醫藥物開發層次上，有一定的潛力在有助於探討藥物對細胞增生與毒性之影響。

參考文獻

1. Zaretsky L, Polonsky M, Shifrut E, et al. Monitoring the dynamics of primary T cell activation and differentiation using long term live cell imaging in microwell arrays. *Lab on a chip*. 2012;12(23):5007-5015.
2. Asphahani F, Thein M, Wang K, et al. Real-time characterization of cytotoxicity using single-cell impedance monitoring. *Analyst*. 2012;137(13):3011-3019.
3. Kim SB, Koo K-i, Bae H, et al. A mini-microscope for in situ monitoring of cells. *Lab on a chip*. 2012;12(20):3976-3982.
4. Bishara W, Sikora U, Mudanyali O, et al. Holographic pixel super-resolution in portable lensless on-chip microscopy using a fiber-optic array. *Lab on a chip*. 2011;11(7):1276-1279.
5. Cha J, Kim J, Ryu S-K, et al. A highly efficient 3D micromixer using soft PDMS bonding. *Journal of micromechanics and microengineering*. 2006;16(9):1778.
6. Zhang M, Wu J, Wang L, Xiao K, Wen W. A simple method for fabricating multi-layer PDMS structures for 3D microfluidic chips. *Lab on a chip*. 2010;10(9):1199-1203.
7. Leclerc E, Sakai Y, Fujii T. Cell culture in 3-dimensional microfluidic structure of PDMS (polydimethylsiloxane). *Biomedical microdevices*. 2003;5(2):109-114.
8. Bichsel CA, Gobaa S, Kobel S, et al. Diagnostic microchip to assay 3D colony-growth potential of captured circulating tumor cells. *Lab on a Chip*. 2012;12(13):2313-2316.
9. Ma L, Zhou C, Lin B, Li W. A porous 3D cell culture micro device for cell migration study. *Biomedical microdevices*. 2010;12(4):753-760.
10. Abaci HE, Devendra R, Smith Q, Gerecht S, Drazer G. Design and development of microreactors for long-term cell culture in controlled oxygen microenvironments. *Biomedical microdevices*. 2012;14(1):145-152.
11. Huang C-W, Lee G-B. A microfluidic system for automatic cell culture. *Journal of micromechanics and microengineering*. 2007;17(7):1266.
12. Wu M-H, Huang S-B, Lee G-B. Microfluidic cell culture systems for drug research. *Lab on a Chip*. 2010;10(8):939-956.