

基于微流体装置的微血管网内红细胞流动和分布特性的研究¹⁾

李 芬* 胡瑞清* 山田崇† 贺 纓*²⁾ 小野直树†

*(中国科学技术大学近代力学系, 合肥 230027)

†(芝浦工业大学机械工学科, 东京 135-8548)

摘要 实体肿瘤血管具有扩张、扭曲、不规则分支以及分支间连接紊乱等特征. 为了考察这些特征对血液流动的影响, 将肿瘤血管简化为垂直相互贯通的微血管网, 借助微流体实验装置, 以一定浓度的红细胞悬液作为流动介质, 研究红细胞在微血管网中的流动和分布特性. 具体实验方案如下: 首先, 采用软刻蚀技术, 在聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 上加工出微血管网; 然后, 采用微注射泵控制微血管网入口处的红细胞悬液流量, 使用倒置显微镜和高速摄影系统观察并记录实验过程; 最后, 通过 Matlab 软件包 Piv-lab 及高速摄影配套软件对获得的视频图像进行处理, 提取红细胞在微血管网中的流动和分布数据. 数据处理结果显示, 红细胞在微血管网中的流动和分布特性受悬液内的红细胞压积 (hematocrit, Hct) 的影响. 红细胞随悬液 Hct 的不同呈现 2 种运动轨迹: 一种为仅沿着轴向微管道流动; 另一种是从轴向微管道流入并穿过径向微管道, 再进入另一侧的轴向微管道. 另外, 入口流量相同时, 红细胞在微血管网中的流动速度随 Hct 变化呈现不同, Hct 为 3% 和 5% 的红细胞速度要明显高于 Hct 为 1% 的红细胞速度.

关键词 肿瘤血管, 微流体装置, 红细胞悬液, 流动特征, 红细胞分布

中图分类号: O359+.2 文献标识码: A doi: 10.6052/0459-1879-13-139

引 言

与正常血管相比, 肿瘤血管在形态、结构、功能上都有很大差异. 形态上, 多数肿瘤微血管呈扩张、扭曲、伸长和囊性状态, 血管分支过多且之间连接紊乱, 导致肿瘤组织具有明显的动静脉灌注又伴随着混乱的血管构成, 经常可见到过多的血管分支及与其一致的血管盲端^[1-4]. 结构上, 不完整甚至缺失的内皮衬套以及中断的基底膜会导致血管的通透性增加, 进而使红细胞等大分子物质外渗, 增加间质液体的体积. 此外肿瘤细胞生长繁殖所产生的固体压对血管及淋巴管形成压迫, 导致血液及淋巴回流受阻^[4]. 这些异常一方面导致肿瘤内部血流供应不均匀, 在肿瘤组织内造成血流灌注减少和灌注缺乏的区域, 该区域会因携氧红细胞减少或者缺失导致组织缺氧, 同样血液灌注缺乏会使得通过血液流动传

输的抗肿瘤药物难以到达, 降低抗癌疗效^[4-5]; 另一方面这些异常又改变了肿瘤组织微环境, 使肿瘤细胞对放疗或部分化疗药物产生抵抗, 诱导耐药性. 所以研究实体肿瘤微循环血流动力学对肿瘤药物治疗具有重要的意义^[3].

物质在血管中的传输很大程度上受血管几何形状影响 (如血管扭曲度、管径大小、以及血管的分支形状和在实体肿瘤中的几何分布等). 由于肿瘤组织内的微血管尺度很小 (微米量级), 很难利用现有的影像技术来了解肿瘤微血管网络结构和血管内流动; 另外, 肿瘤血管的复杂性给研究血管内血液流动规律和物质输送特性造成极大困难. 动物背部视窗方法为在体研究肿瘤血管内血液流动提供了有效的方法, 借助荧光示踪粒子等辅助手段, 研究人员发现, 并不是所有的肿瘤血管都有血液灌注^[6].

除了动物实验, 数值模拟也是研究肿瘤微循环

2013-05-06 收到第 1 稿, 2013-10-17 收到修改稿.

1) 中日医学协会国际合作项目, 中国博士后科学基金项目 (2011491478), 安徽自然科学基金项目 (11040606M09) 和中央高校基本科研业务专项资金项目 (WK2100023009) 资助.

2) 贺纓, 教授, 主要研究方向: 血流动力学, 生物传热传质, 沸腾传热. E-mail: yhe@ustc.edu.cn

的主要方法, 研究人员一般将复杂的肿瘤微血管近似成一个规则的网状结构或者多孔结构来研究. Munn 等^[7]采用一个理想网状模型, 模拟了经过抗血管内皮生长因子治疗后, 肿瘤血管重建过程. 在该模型中混乱的肿瘤血管被模拟成置有单分散排列圆柱的多孔方腔. 另外, 他们还采用二维理想网络模型模拟携氧粒子在血管网中的分布以及氧在肿瘤组织中的分布情况. 在该模型中, 肿瘤动静脉之间由平行相互贯通的管径不一的微管网组合连接. 其结果表明在红细胞分布较少和流量较小的血管周围, 氧分压相应较低^[7]. Baish 等^[8]基于侵入逾渗网络模型对肿瘤血管非均质性引起的氧输送特性的不均匀性进行了探讨. 之后, Baish 等^[9]构建了正方形血管网络肿瘤微循环模型. 考虑了血液在正方形均匀排列的弹性毛细管内的流动, 毛细血管之间的间质流体流动, 以及跨毛细血管壁的渗透. Chapman 等^[10]基于 Pozrikidis^[11]的渗透性直管流动模型获得了水力传导和分形渗透系数的理论表达式, 并进一步建立了血管网内流体和间质流体的连续介质模型, 通过分析得出, 毛细血管网和间质流体内的流动都展现多孔介质流动特性. Obrist 等^[12]模拟了 550 个红细胞在 11×11 的正方形微管道网中的流动分布, 该工作考虑了微管网结构和红细胞自身流动性对红细胞流动分布的影响. 结果同样显示, 稳定状态下红细胞在流动速度较慢的区域聚集较多, 在流动速度较快的区域聚集较少. Dhadwal 等^[13]采用同样的方法, 在研究肺部毛细管解剖结构变化对血管中血液流动和压力梯度变化影响时, 将单个肺泡隔中的毛细管网简化成 6×6 的相互贯通的微管网阵列来处理. Huang 等^[14]基于更真实的肺泡毛细管网模型, 模拟了红细胞和嗜中性粒细胞在肺部毛细血管中流动时的压力、红细胞压积以及流速分布. 从这些研究可以看出, 规则排列的微管网结构或者多孔结构模型在一定程度上能够模拟肿瘤组织(或者其他组织)血管多分支、排列混乱、血管之间随机连接等特征.

随着微流控技术的发展, 微流控技术与传统生物学技术相结合, 为体外再现肿瘤组织微循环流动提供了一个良好的平台. 微流控加工技术已经非常成熟, 可以根据需要加工出尺度在微米量级的各种形状微流动通道^[15-16]. 而且使用一些材料(如聚二甲基硅氧烷 polydimethylsiloxane, PDMS)加工出的微流动芯片具有良好的生物亲和性, 在体外研究血管生成和生物细胞流动特性方面得到了广泛应用^[17]. Sri-

gunapalan 等^[18]基于微加工技术建立了三层结构微流体模型模拟血管微环境, 该模型由两层 PDMS 微管道夹杂一层多孔聚对苯二甲酸乙二醇酯 (polyethylene glycol terephthalate, PET) 膜组成. 他们利用此装置再现了包含剪应力、细胞外基质蛋白、生物信号传导等多细胞之间相互作用过程. Chen 等^[19]利用 PDMS 微加工技术构建了网络微通道结构, 比较了正常红细胞和变形能力降低后的红细胞在微管网中的流动行为. 他们发现正常的红细胞可以较容易地通过微血管网, 而变形能力较差的红细胞则易滞留甚至堵塞在微管网的某些区域. 但是, 目前完全针对肿瘤微循环血流特征的体外实验模拟还很少见.

红细胞是血液主要组成成分, 占血液有形成分 90% 以上. 血液在微血管中流动时, 红细胞之间、红细胞与流体之间、红细胞与管壁之间的相互作用对血液流动的影响不容忽视. 红细胞在微血管中流动分布不均匀可能会导致流体黏度变化, 最终影响微血管中的压力分布. 同时, 有许多实验关注管道结构对红细胞变形及聚集作用的影响, 例如, 红细胞通过双曲型狭窄通道时的变形^[20], 红细胞在狭窄微管道内的运动及聚集特性^[21]; 红细胞通过直管、渐扩、渐缩的矩形槽道时, 流体黏度、红细胞压积以及流速对红细胞流变学特性的影响^[22]. 可以推测, 红细胞在复杂的肿瘤血管网中流动时, 其流变特性也可能会有变化.

因此, 本文借助微加工技术, 首先针对肿瘤血管多分支、分支间多连接、血管扩张等特征制作微流动芯片, 以红细胞悬液作为流动介质, 研究红细胞在肿瘤血管中的流动规律和分布特征. 最终希望通过考察红细胞的流动分布特征, 研究肿瘤组织内的氧分布和物质输运规律.

1 实验方法和材料

1.1 微管道设计及制作

实体肿瘤血管具有扩张、扭曲、囊状、分支不规则且排列混乱等特征^[23](如图 1(a) 所示). 根据肿瘤血管的生理结构和参考文献中提到的网络和多孔结构, 复杂的肿瘤血管被分形简化为理想的血管网结构. 该网状微管结构总宽度为 250 μm , 在结构内规则地置有 6 组长 100 μm 宽 50 μm 代表肿瘤组织的障碍物, 除了第 4 与第 5 组之间间隔为 200 μm , 其余组间间隔均为 50 μm . 每组 2 个障碍物平行排列, 平行间距以及与上下管壁间距均为 50 μm (如图 1(b) 所示). 该

结构能够表征肿瘤血管高度分叉、复杂连接 ($50\text{ }\mu\text{m}$ 的微管网垂直相互贯通)、血管扩张 (相互连接的微管道管径分别为 $50\text{ }\mu\text{m}$, $200\text{ }\mu\text{m}$, $250\text{ }\mu\text{m}$) 等特征. 并且实体肿瘤血管管径在几个微米至几百微米之间, 该体外模型尺寸也在此范围内.

微管道采用软刻蚀技术加工, 具体步骤如下 [15-16]:

(1) 根据设计的模板打印出胶片, 经过甩胶、烘干、曝光、显影等步骤制作出模具.

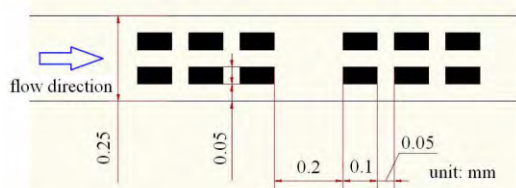
(2) 按照本体与固化剂 10:1 配制 PDMS 溶液, 搅拌均匀后抽真空, 使 PDMS 中气泡完全排出. 然后将液体浇注在模具上, 一定温度下放置固化即完成截面为矩形的槽道制作.

(3) 将制作好的矩形槽道和作为基底的玻璃板同时置于紫外光下连续照射 3h, 照射结束后立即将 PDMS 和玻璃板黏合在一起, 施以一定的压力并置于 90° 平板加热器上加热 1h 即可实现 PDMS 与基板的黏合, 加工好的微管道如图 1(c) 所示. 微管网深度约 $35\text{ }\mu\text{m}$.



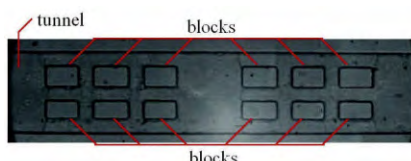
(a) 实体肿瘤内血管网结构示意图

(a) The schematic diagram of vascular network in solid tumor



(b) 微管道设计示意图

(b) The schematic diagram of designed micro-network channel



(c) PDMS 微管道实物图

(c) The photograph of the fabricated micro-network channel

图 1 微血管网设计及制作

Fig. 1 The schematic diagram for the designed and fabrication of the micro-network channel

1.2 红细胞悬液制备

实验中使用的红细胞取自大鼠腹腔动脉, 红细胞悬液配制方法参考文献 [21], 具体步骤为:

(1) 取大白鼠腹腔动脉血液与生理盐水 1:1 稀释.

(2) 4°C 条件下, 转速为 1000 min^{-1} 离心 10 min, 弃上清. 再加生理盐水, 如此反复离心 3 次.

(3) 最后得到的红细胞浓缩液再用生理盐水调配至实验需要浓度.

1.3 实验方案

尝试配制红细胞压积 (homatocit, Hct) 分别为 1%, 2%, 3%, 5% 的红细胞悬液, 并在显微镜下观察红细胞悬液流动. 发现 Hct 为 1% 的悬液, 红细胞数量很少, 此时红细胞对流动影响较小; 当 Hct 增加到 5% 时, 红细胞在微管道中已经较为密集, 但仍可以观察到较为清晰的细胞边界, 同时也足以对流动产生明显影响; 继续提高 Hct 后, 由于红细胞数量过多, 红细胞大量重叠或聚集, 分辨细胞边界变得极为困难, 同时红细胞悬液的沉积对于实验结果影响变得显著. 从文献中可知, 大多运用红细胞悬液作为流动介质的实验所采用的红细胞压积在 1%~8% 之间 [24]. 因此, 根据文献调研结果, 并为了平衡实验结果的有效性、可信度和实验控制、观测的难度, 选取 5% 作为本实验用 Hct 上限.

实验方案如表 1 所示, 红细胞悬液以 0.05, 0.10, 0.20 ml/h 的入口流量进入微血管网. 采用微注射泵 (NE-1000.USA) 控制红细胞悬液在微血管网中的流动速度, 通过倒置显微镜 (舜宇 DSY5000X, 南京) 和高速摄影系统 (Fastcam SA5, Photron) 观察并记录实验结果. 高速摄影拍摄速度全屏可以达到 7500 s^{-1} , 分辨率为 1024×1360 .

表 1 红细胞悬液的入口流量和压积

Table 1 Inlet flow rate and Hct of RBC suspension

Hct	Flow Rate/(ml·h ⁻¹)		
1%	0.05	0.10	0.20
2%	0.05	0.10	0.20
3%	0.05	0.10	0.20
5%	0.05	0.10	0.20

1.4 数据处理

由于显微镜的观察区域有限, 实验只能关注如图 2 中所示的红圈区域 (目标区域), 因此数据处理也是针对该区域进行. 本文中数据处理方法主要包括: (1) 基于 Matlab 的软件包 PIV-lab 软件获得红细

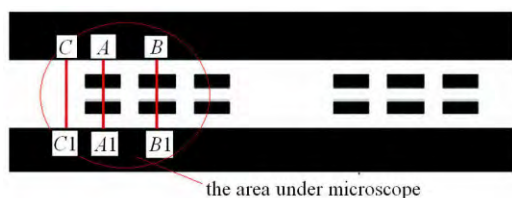


图2 实验观测及数据处理区域示意图

Fig. 2 The area of experimental observation and data processing

胞在微血管网中目标区域的流场; (2) 基于 Photron 高速摄影自带的软件 (Photron Fastcam Viewer), 通过追踪单个红细胞经过连续 10 帧图片时的移动位移, 根据高速摄影拍摄速度计算出红细胞流动速度. 在本文中主要获得如图 3 所示的 A-A1, B-B1, C-C1 处红细胞沿管道径向的速度分布.

2 实验结果与分析

2.1 Hct 为 1% 时红细胞在微血管网中的流动和分布特征

当 Hct 为 1% 的红细胞悬液在微管道网络中流动时, 红细胞流动轨迹仅分布在沿轴向的微管道中, 而沿径向的微管道中则无红细胞流过. 此结果与纯水在微血管网中的流动特征非常相似. 图 3 为稳定状态时红细胞在微血管网 A-A1 和 B-B1 处的速度分布, 从图中可以看出, 红细胞沿轴向微血管网流动的最大速度可达 5.7 mm/s. 为了进行比较, 在图 1(b) 中的微管道网结构内对纯水流动进行数值分析, 左右两侧分别为流体入口和出口. 整个计算区域为 600×100 的网格, 使用离散格子玻尔兹曼方法 (lattice Boltzman method, LBM) 方法进行计算. 边界处

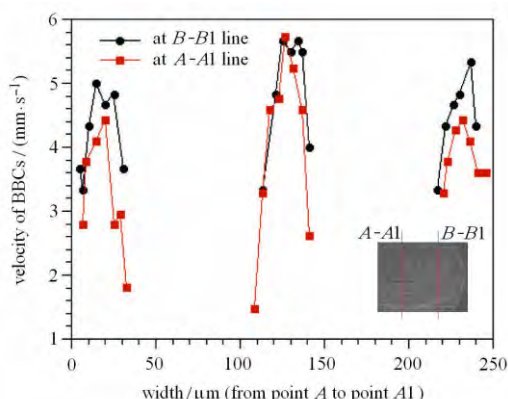
图3 红细胞在 A-A1 处和 B-B1 处的速度分布
(入口流量: 0.10 ml/h, Hct: 1%)

Fig. 3 Velocity profiles of RBCs at A-A1 and B-B1 line (Inlet flow rate: 0.10 ml/h, Hct of suspension: 1%)

使用 Bounce back 格式进行处理; 进出口处采用 Zou 等^[25] 的动力学格式处理; 入口速度分布为均匀来流, 计算的流动雷诺数为 0.1065, 与实验情况基本相同, 计算结果如图 4 所示 (图 4 中的结构与实验中的观察位置相同). 从图 4 显示的流线可以看出, 流动仅在沿轴向的微管道中发生, 而沿径向的微管道中没有流体通过. 另外从速度场云图可以看出, 水在沿轴向微管道中的最大流速可达到 5.6 mm/s, 而在沿径向微管道中的流速几乎为零, 与实验结果完全相符. 这说明红细胞悬液的 Hct 较低时, 红细胞的存在对流体在微血管网中的流动没有造成明显影响.

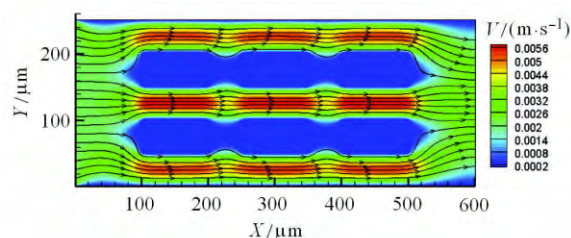


图4 多孔结构内纯水流动速度场分布的 LBM 数值模拟结果

Fig. 4 The result of LBM simulation for velocity distribution of pure water flowing through the porous structure

2.2 Hct 增加时红细胞在微血管网中的流动和分布特征

随着微血管网中红细胞悬液 Hct 的增加 (增加到 2%, 3%, 5%), 红细胞流动轨迹发生了很大变化. 从实验结果来看, 红细胞流动轨迹可归类为两种情况:

(1) 红细胞沿轴向微管道运动

这一运动轨迹类似于红细胞悬液 Hct 为 1% 时的运动轨迹, 即红细胞只沿轴向微管道流动, 没有进入并通过径向微管道. 图 5 中的 A, B, C 3 处的红细胞分别代表微血管网中 3 种典型的红细胞沿轴向运动的轨迹. 从红细胞运动时间-轴向位移曲线可以看出 (图 6): A 处红细胞靠近径向管道, 流动受到径向管道的影响, 在流经径向管道附近时流动速度会变慢, 表现在时间-轴向位移曲线中是一条折线, 中

图5 红细胞在沿轴向微管道中的流动轨迹
(入口流量: 0.05 ml/h, Hct: 2%)

Fig. 5 The trajectory of RBCs flowing in the axial direction channels (inlet flow rate: 0.05 ml/h, hematocrit of suspension: 2%)

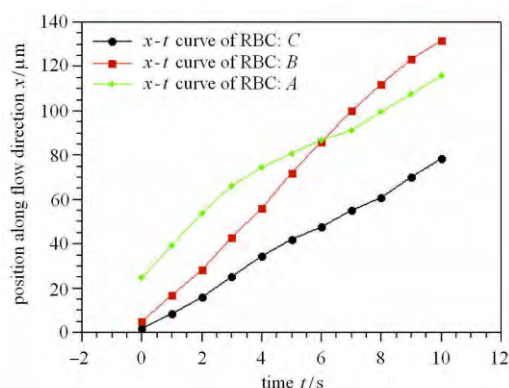


图 6 红细胞在沿轴向微管道中流动时的时间-轴向位移曲线
(入口流量: 0.05 ml/h, Hct: 2%)

Fig. 6 The $x-t$ curves of RBCs flowing in the axial direction channels
(inlet flow rate: 0.05 ml/h, hematocrit of suspension: 2%)

间时刻曲线的斜率变小; B 处红细胞位于微管道中间位置, 受径向微管道干扰较小, 流动速度较大, 表现在时间-轴向位移曲线中斜率最大; 而 C 处红细胞靠近管道下边界, 受径向微管道干扰较小, 但是受边界效应的影响较大, 所以速度相对较小, 在时间-轴向位移曲线中斜率最小。

(2) 红细胞进入并通过径向微管道

在这一运动轨迹中, 红细胞会从轴向微管道进入并通过径向微管道再一次进入轴向微管道, 如图 7 所示. 红细胞进入并通过径向微管道的时间-轴向位移曲线与仅沿轴向微管道运动的明显不同. 从图 8 可以看出, 红细胞在径向微管道中的流动速度要远远小于在轴向微管道中的流动速度. 并且, 红细胞悬液 Hct 为 5% 时流经径向微管道的红细胞数量远远大于红细胞悬液 Hct 为 2% 和 3% 时的. 红细胞在微管道网络中流动时能够进入并通过径向微管道, 这与水在微管道网中的流动规律不一样. 其原因有两方面: 其一是随着红细胞悬液 Hct 的增加, 红细胞与红细胞之间的相互作用增强, 导致有很少一部分红细胞能够穿过径向微管道; 其二是红细胞悬液的黏度与 Hct 有关, 在红细胞悬液流动过程中, 由于红细胞分布不均匀导致流体的表观黏度在微管道中分布



图 7 红细胞流经径向微管道时的流动轨迹
(入口流量: 0.05 ml/h, Hct: 2%)

Fig. 7 The trajectory of RBCs flowing through the radial direction channels (inlet flow rate: 0.05 ml/h, hematocrit of suspension: 2%)

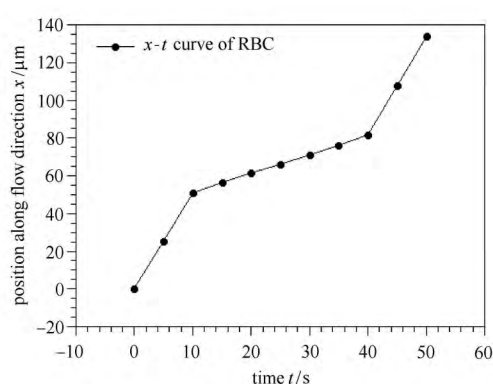


图 8 红细胞流经径向微管道时的时间-轴向位移曲线
(入口流量: 0.05 ml/h, Hct: 2%)

Fig. 8 The $x-t$ curves of RBCs flowing through the radial direction channels (inlet flow rate: 0.05 ml/h, hematocrit of suspension: 2%)

不均匀, 微管道网中流动阻抗也随之不均匀, 最终影响红细胞流动分布。

2.3 Hct 对红细胞在微血管网中的速度分布影响

相同条件下, 即入口流量同为 0.10 ml/h, 使用 Hct 分别为 1%, 3%, 5% 的红细胞悬液作为流动介质时, 红细胞在微血管网中 $A-A_1$ 处的速度分布结果如图 9 所示. 当红细胞悬液 Hct 为 1% 时, 红细胞流经微血管网的最大流速约为 5 mm/s; 当红细胞悬液 Hct 增加到 3% 和 5% 时, 相同入口流量条件下, 最大速度可以达到 22 mm/s 左右. 并且, 这种现象不仅出现在微血管网中, 在进入微管道网之前的管道中 (管道 $C-C_1$ 处) 就已经出现. 从图 10 中可以看出, 管道 $C-C_1$ 处, 红细胞悬液 Hct 为 1% 时, 红细胞最大速度为 3 mm/s 左右; 当红细胞悬液 Hct 增加到 3%, 5% 时, 红细胞的最高速度可以达到 8 mm/s 左右 (由于 $C-C_1$ 位置处于微血管网入口前 50 μm , 流动已经受到微血管网结构的影响, 红细胞沿管道径向速度分布出现波动, 类似结果也可在图 4 数值模拟结果中观察到). 这说明相同入口流量时, 入口红细胞悬液的 Hct 会影响红细胞在微血管网中的流速分布。

另外, 相同入口流量使用不同 Hct 的红细胞悬液时, 红细胞在 $C-C_1$ 处沿管径的速度分布直接影响红细胞进入微血管网中 ($A-A_1$ 处) 的速度分布. 从图 9 和图 10 中可以看出, 当红细胞悬液 Hct 为 1% 时, 红细胞在 $C-C_1$ 处的速度分布波动较小 (与图 4 中模拟计算结果较吻合), 进入微血管网后 ($A-A_1$ 处), 红细胞在 3 个轴向微管道中的速度值也相应波动较小. 随着红细胞悬液 Hct 的增加, 红细胞在 $C-C_1$ 处的速

度有了较大的波动,尤其是当红细胞悬液的 Hct 为 5% 时,红细胞在靠近管道 C 侧的速度相对偏小,而靠近管道 C1 处的速度相对偏大.待红细胞进入微血管网中时(A-A1 处),红细胞的速度分布也出现了类似特征,靠近管道 A 侧的红细胞速度相对小,而靠近管道 A1 侧红细胞速度相对大.这种速度分布的不均匀性可能是由红细胞在管道内分布不均匀造成的.红细胞悬液 Hct 较小时,红细胞对流体的影响较小,红细胞的速度分布相对均匀,红细胞分布也相对均匀.随着红细胞悬液 Hct 增大,管道内局部区域红细胞分布的变化会影响流体黏度,进而影响该区域红细胞的流速(C-C1 处),而分支处红细胞流速的不

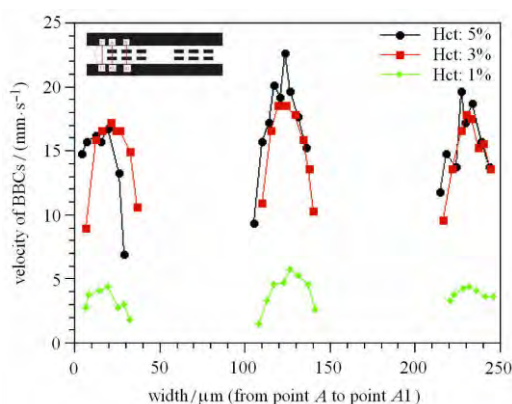


图 9 相同入口流量,不同 Hct 时红细胞在 A-A1 处速度分布
(入口流量: 0.10 ml/h, Hct: 1%, 3%, 5%)

Fig. 9 Velocity profiles of RBCs at A-A1 line with different Hct under the same inlet flow rate (inlet flow rate: 0.10 ml/h, hematocrit of suspension: 1%, 3%, 5%)

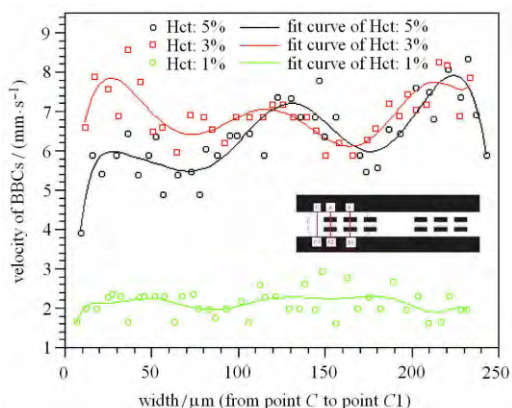


图 10 相同入口流量条件下,不同 Hct 对红细胞在 C-C1 处速度分布的影响(入口流量: 0.10 ml/h, Hct: 1%, 3%, 5%)

Fig. 10 Velocity profiles of RBCs at C-C1 line with different Hct under the same inlet flow rate (inlet flow rate: 0.10 ml/h, hematocrit of suspension: 1%, 3%, 5%)

均匀性又会影响红细胞分布(A-A1 处).由此,可以推断,或许可以借助一些辅助手段通过控制较大血管内的红细胞分布来改变下游微血管网内的红细胞分布.

根据 Fahraeus-lindqvist 效应,当血管半径小于 1 mm 时,血液从大直径管道或者容器进入小直径管道或容器,红细胞压积将会降低,表观黏度也会随之降低.根据 Fahraeus 效应,红细胞压积与红细胞流动速度存在以下的关系式

$$\chi = \frac{H_T}{H_D} = \frac{U_m}{U_c}$$

式中 H_T 为小直径管道中的 Hct; H_D 是大直径管道中的 Hct; U_m 为小直径管道中的血液的平均流速; U_c 为小直径管道中红细胞流速.由 Fahraeus 效应得知, $H_T < H_D$,所以在小直径管道中红细胞流动速度 U_c 要大于血液流动速度 U_m .本文实验使用的微管道结构有 3 部分组成:管径为 1.5 mm 的接口段、管径为 250 μm 的连接段和管径为 50 μm 的微血管网结构,其中微血管网结构是目标段.当红细胞悬液的 Hct 为 1% 时,红细胞对流体流动的影响较小,所以 Fahraeus 效应不明显,此时的 U_m 可以粗略地认为与 U_c 相当.随着红细胞悬液的 Hct 增加到 3%, 5% 时,红细胞对流动影响不可忽略,在管道的连接段和微血管网段出现了 Fahraeus 效应, $U_c > U_m$.所以在入口流量相同的条件下,以 Hct 为 3% 和 5% 红细胞悬液作为流动介质时,红细胞在微血管网中的流速要大于 Hct 为 1% 时红细胞流速.

另外, Pozrikidis^[11] 模拟红细胞在圆形管道中流动特征时,研究了当红细胞从大管径管道进入小直径管道时,管径比 b/a (b 为大管道直径, a 为小管道直径) 对红细胞压积比 H_T/H_D 的影响.图 11 为本

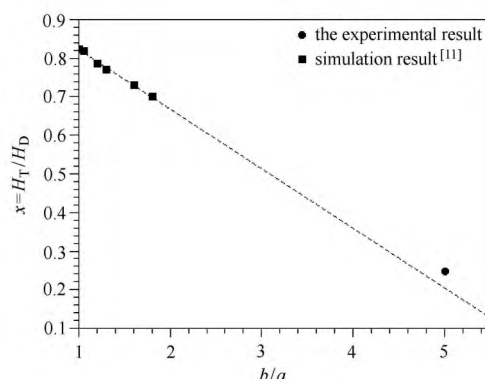


图 11 管道中 Hct 比随管径比变化

Fig. 11 The variation of the ratio of Hct with the ratio of tube diameters

文实验结果和 Pozrikidis 数值模拟结果^[11]对照图. 从图中可以看出, H_T/H_D 的值会随着 b/a 的增加而减小, 当 b/a 从 1.0 增加到 2.0 时, H_T/H_D 的值从 0.82 降到 0.70. 一般数值模拟都是针对 Y 型分叉血管, 所以管径比的变化范围在 1.0 和 2.0 之间, 这样表明, 红细胞在子血管中分配的 H_T/H_D 值就不会小于 0.5. 在本文实验中红细胞悬液从管径为 $250\mu\text{m}$ 的管道进入 3 根管径分别为 $50\mu\text{m}$ 的微管道, 此时大小管径比 b/a 的值为 5, 由实验所获的 U_c/U_m 可以推知 H_T/H_D 为 0.249, 位于 Pozrikidis 所获结果延长线的上方, 即略高于模拟推算值. 虽然管道直径换算等因素存在误差, 实验结果与数值模拟结果的趋势基本相匹配.

3 结 论

为了考察肿瘤血管结构对微循环血液流动的影响, 本文运用垂直相互贯通的微流控芯片管道模拟肿瘤血管网络, 以红细胞悬液作为流动介质, 研究了红细胞在微血管网中的流动和分布特征. 结果表明:

(1) 红细胞在微血管网中的流动分布受红细胞悬液 Hct 的影响. 当红细胞悬液 Hct 为 1% 时, 红细胞的存在对流体流动的影响较小, 红细胞运动速度与流体流速基本相同; 而且, 红细胞仅沿轴向微管道流动, 径向微管道中则无红细胞流过. 当红细胞悬液的 Hct 增至 2%, 3%, 5% 时, 红细胞对流体流动的影响增加, 红细胞运动速度明显大于流体流速, 且在各个管道内的运动速度差异也增大. 一部分红细胞会从轴向微管道穿过径向侧支微管道再进入轴向微管道, 红细胞的运动呈现多样性.

(2) Fahraeus 效应 (较细管道与较粗管道内的红细胞压积不同) 存在于微血管网内, 且随入口红细胞压积和管道结构而变化. 当入口流量相同而入口红细胞悬液 Hct 增加时, 相同管径内的红细胞流速增大, 从而使较细管道与较粗管道内的红细胞压积比 (H_T/H_D) 减小. 这一结果与已有研究结果^[26-28]一致.

红细胞的流动、变形以及聚集等流变学特性对微循环的状态, 特别是对氧输运有很大影响, 以往已有很多相关研究^[19,26,28-29], 但复杂微血管网内的红细胞流动和分布特性的实验研究还很少. 微血管网内的氧输运受到血红蛋白与氧的相互作用以及红细胞与组织之间氧的扩散特性影响^[30]. 已有的数值分析结果表明, 红细胞在流速较慢的区域聚集较多,

而在流速较快的聚集区域聚集较少^[7,12]. 本实验结果显示, 红细胞在各个分叉管道内的流速会随着红细胞压积的变化呈现不均匀性, 红细胞的运动轨迹也因此变得多样, 支持了文献^[7,12]的结果.

当然, 本文实验中所采用的微血管网是规则的, 不能完全反映实际肿瘤血管网的复杂性, 但所获得的多分叉和贯通结构对红细胞流动和分布特性的影响规律具有一定普遍意义, 有助于进一步研究红细胞在肿瘤血管内的流动分布规律. 在此实验基础上, 可以进一步运用微流体技术模拟实体肿瘤微血管结构, 使得实验模拟逐步接近肿瘤实际情况. 另外, 肿瘤微循环的复杂性不仅体现在血管网结构, 也体现在管壁的高渗透性以及和间质流体的相互作用方面. 许多的数值研究已经针对肿瘤血管内外的流体流动进行了研究, 吴洁等^[31]构建了包含半球体肿瘤组织的六面体组织, 并模拟了带有母血管的三维肿瘤血管网的生成过程, 分析了毛细血管网和间质流体压力分布, 对新生肿瘤血管的生长及较大尺度内的肿瘤组织血液动力学进行了较全面的分析. 在此基础上, 吴洁等^[32]以及 Chaplain 等^[33]建立了抗肿瘤血管生成和肿瘤血液动力学模型, 分析了抗血管生成治疗后, 新生血管分叉特性以及肿瘤内血液灌注率和间质高压等的变化. 同时, 近期的芯片实验室杂志 (Lab on a Chip) 发表了一篇基于 Voronoi 排布结构构建多孔介质微流体装置, 并考察单相和油水两相在这种新型微流体装置中流动特性的文章^[34]. 这种排布结构的芯片虽然是为了模拟岩土结构, 但与微血管的分形结构非常相近, 也可以用来模拟真实结构微血管网. 因此, 结合微流体装置制作, 计算机建模, 以及动物视窗观察技术完全能在体外对真实肿瘤微血管结构进行模拟并以此考察其流动机制.

本文中采用了一系列低 Hct 的红细胞悬液作为流动介质. 由于芯片制作和流动观测手段所限, 大多数运用红细胞悬液作为流动介质的实验所采用的红细胞压积在 1%~8% 之间^[24]. 已有实验研究正在不断尝试运用较高的 Hct(14%) 考察红细胞的流动特性^[35], 目前所用红细胞悬液虽然与人体真实血液 Hct 有一定差距, 但能够体现出 Hct 影响红细胞在微血管网中流动分布规律.

在进一步的工作中, 将会通过实验考察红细胞流动特性与压降的关系以揭示微血管网内引起流速不均的原因.

参考文献

- McDonald DM, Choyke PL. Imaging of angiogenesis: From microscope to clinic. *Nature Medicine*, 2003, 9(6): 713-725
- Joanne RL, Thomas CS, Eva MS, et al. Microvascular architecture in a mammary carcinoma: branching patterns and vessel dimensions. *Cancer Research*, 1991, 51: 265-273
- 游捷. 肿瘤微环境和血管正常化在中西医结合治疗肿瘤中的作用机制探讨. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(8): 1127-1131 (You Jie. Study on the tumor microenvironment and tumor vascular normalization in integrative treatment of tumor by Chinese medicine and western medicine. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 2011, 31(8): 1127-1131 (in Chinese))
- Siemann DW. Vascular-targeted Therapies in Oncology. New York: John Wiley & Son, Ltd, 2006
- Munn LL. Aberrant vascular architecture in tumors and its importance in drug-based therapies. *Therapeutic Focus*, 2003, 5(9): 396-403
- Koehl GE, Gaumann A, Geissler EK. Intravital microscopy of tumor angiogenesis and regression in the dorsal skin fold chamber: Mechanistic insights and preclinical testing of therapeutic strategies. *Clin Exp Metastasis*, 2009, 26: 329-344
- Munn LL, Kamoun W, Dupin M, et al. Modeling structural and functional adaptation of tumor vessel networks during antiangiogenic therapy. In: Jackson TL, ed. Modeling Tumor Vasculature: Molecular, Cellular, and Tissue Level Aspects and Implications. New York: Springer, 2012: 213-233
- Baish JW, Gaitz Y, David AB, et al. Role of tumor vascular architecture in nutrient and drug delivery: An invasion-percolation-based network model. *Micro Res*, 1996, 51: 27-346
- Baish JW, Netti PA, Jain RK. Transmural coupling of fluid flow in microcirculatory network and interstitium in tumors. *Microvascular Research*, 1997, 53: 128-141
- Chapman SJ, Siple RJ, Jawad R. Multiscale modeling of fluid transport in tumors. *Bulletin Math Biol*, 2008, 70: 2334-2357
- Pozrikidis C. Axisymmetric motion of a file of red blood cells through capillaries. *Physics of Fluids*, 2005, 17: 031503-1—14
- Obrist BD, et al. Red blood cell distribution in simplified capillary networks. *Phil Trans R Soc A*, 2010, 368: 2897-2918
- Dhawdal A, Wiggs B, Doerschuk CM, et al. Effects of anatomic variability on blood flow and pressure gradients in the pulmonary capillaries. *Journal of Applied Physiology*, 1997, 83: 1711-1720
- Huang YQ, Doerschuk CM, Kamm RD. Computational modeling of RBC and neutrophil transit through the pulmonary capillaries. *J Appl Physiol*, 2001, 90: 545-564
- Byung HJ, Linda M, Van L, et al. Three-dimensional micro-channel fabrication in polydimethylsiloxane (PDMS) elastomer. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 2000, 9(1): 76-81
- Wang GJ, Ho KH, Hsu SH, et al. Microvessel scaffold with circular microchannels by photoresist melting. *Biomed Microdevices*, 2007, 9: 657-663.
- Whitesides GM, Ostuni E, Takayama S. Soft lithography in biology and biochemistry. *Annu Rev Biomed Eng*, 2001, 3: 335-373
- Srigunapalan S, Lam C, Wheeler AR, et al. A microfluidic membrane device to mimic critical components of the vascular microenvironment. *Biomicrofluidic*, 2011, 5: 013409(1-9)
- Chen YC, Chen GY, Lin YC, et al. A lab-on-a-chip capillary network for red blood cell hydrodynamics. *Microfluid Nanofluid*, 2010, 9: 585-591
- Lee SS. Extensional flow-based assessment of red blood cell deformability using hyperbolic converging microchannel. *Biomed Microdevices*, 2009, 11: 1021-1027
- Fujiwara H, Ishikawa T, Lima Ret al. Red blood cell motions in high-hematocrit blood flowing through a stenosed microchannel. *J Biomech*, 2009, 42: 838-843
- Tomaiuolo G. Start-up shape dynamics of red blood cells in microcapillary flow. *Microvascular Research*, 2011, 82: 35-41
- Marcucci F, Corti A. How to improve exposure of tumor cells to drugs — Promoter drugs increase tumor uptake and penetration of effector drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2011, 64: 53-68
- Chen B, Guo F, Xiang H. Visualization study of motion and deformation of red blood cells in a microchannel with straight, divergent, and convergent sections. *J Biol Phys*, 2011, 37: 429-440
- Zou Q, He X. On pressure and velocity boundary conditions for the lattice Boltzmann BGK model. *Phys Fluids*, 1997, 8: 1591-1597
- Maeda N. Erythrocyte rheology in microcirculation. *Jpn J Physiol*, 1996, 46: 1-14
- Mchedlishvili G, Maeda N. Blood flow structure related to red cell flow: A determinant of blood fluidity in narrow microvessels. *Jpn J Physiol*, 2001, 51: 19-30
- Goldsmith HL, Cokelet GR, Gaetgens PR. Fahraeus: Evolution of his concepts in cardiovascular physiology. *Am J Physiol*, 1989, 257: H1005-H1015
- Tomaiuolo G, Guido S, Cassinese A. Analysis of red blood cell deformation in a microfluidic device. In: Proc. ASME 2010 Global Cong. On Nanoeng. For Med. & Bio., 2010, NEMB2010-13348-1-2
- 前田信治. 赤血球の微小循環とレオロジー. *ながれ*, 2002, 21: 129-134 (Maeda N. Microcirculation of erythrocytes in relation to their rheological properties. *Nagare (Fluid Flow)*, 2002, 21: 129-134 (in Japanese))
- 吴洁, 许世雄, 赵改平等. 实体肿瘤血液动力学的三维数值模拟. 医用生物力学, 2006, 13: 8-13 (Wu Jie, Xu Shixiong, Zhao Gaiping, et al. 3D Numerical simulation of hemodynamics in solid tumor. *Journal of Medical Biomechanics*, 2006, 13: 8-13 (in Chinese))
- 吴洁, 丁祖荣, 蔡彦等. 血管抑素与内皮抑素作用下抗血管生成治疗对肿瘤血管网与微环境影响的模拟研究. 应用数学和力学, 2011, 32(4): 417-427 (Wu Jie, Ding Zurong, Cai Yan, et al. Simulation of tumor microvasculature and microenvironment response to anti-angiogenic treatment by angiostatin and endostatin. *Applied Mathematics and Mechanics*, 2011, 32(4): 417-427 (in Chinese))
- Chaplain MAJ, McDougall SR, Anderson ARA. Blood flow and tumour-induced angiogenesis: dynamically adapting vascular networks. In: Jackson TL, ed. Modeling Tumor Vasculature: Molecular, Cellular, and Tissue Level Aspects and Implications. New York: Springer, 2012: 67-212
- Wu MJ, Xiao F, Johnson-Paben RM, et al. Single and two phase flow in microfluidic porous media analogs based on Voronoi tessellation. *Lab on a Chip*, 2012, 12: 253-261

35 Leble V, Lima R, Dias R, et al. Asymmetry of red blood cell motions in a microchannel with a divergent and convergent bifurcation.

Biomicrofluidics, 2011, 5: 044120-1-15

(责任编辑: 周冬冬)

THE OBSERVATIONS OF THE FLOW BEHAVIOR AND DISTRIBUTION OF RED BLOOD CELLS FLOWING THROUGH A MICRO-NETWORK CHANNEL¹⁾

Li Fen* Hu Ruiqing* Yamada Takashi[†] He Ying^{*,2)} Ono Naoki[†]

^{*}(University of Science and Technology of China, Department of Modern Mechanics, Hefei 230027, China)

[†](Shibaura Institute of Technology, College of Engineering, Tokyo 135-8548, Japan)

Abstract The structure of vascular network in solid tumor is extremely disordered and non-uniformed. These characteristics result in the complexity and diversity of the blood flow in tumor microcirculation which eventually make drug delivery and targeted therapy difficult in solid tumor. In order to investigate the influence of tumor microvascular network on the blood flow, a vertical interconnected micro-network channel was fabricated by soft lithographical method in this work, designed to simulate the expanding, multi-branched and multi-interconnected tumor vascular network. Employing the micro-flow-system, the red blood cell (RBC) suspension was injected into micro network channel at a certain speed. Inverted microscope was used to observe the migration of RBCs and the sequential images were recorded. PIV-lab package of Matlab and the tool box of the high-speed video camera were used to process the image data. The results show that, hemotocrit (Hct) level of RBC suspension is the main factor to affect the flow and distribution of RBCs in the micro-network. The trajectories of RBCs in the micro-network vary with different Hcts. When Hct level is as low as 1%, the RBCs in the micro-network flow only along the axial direction of the channels, while Hct level becomes higher, some RBCs will flow across the radial channel and the two types of RBC flow trajectories appeared. Furthermore, at the same inlet flow rate, the speeds of RBCs in the micro-network show difference with different Hct levels. The velocities of RBCs with 3% and 5% Hct levels are evidently higher than those of RBCs with 1% Hct level.

Key words tumor vasculature, microfluidics devices, RBC suspension, flow behavior, RBC distribution

Received 6 May 2013, revised 17 October 2013.

1) The project was supported by International Collaborative Research Fund of Japan-China Medical Association, China's Post-doctoral Science Fund (2011491478), Anhui Provincial Natural Science Foundation (11040606M09) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (WK2100023009).

2) He Ying, professor, research interests: hemodynamics, bioheat and mass transfer, boiling heat transfer. E-mail: yhe@ustc.edu.cn