

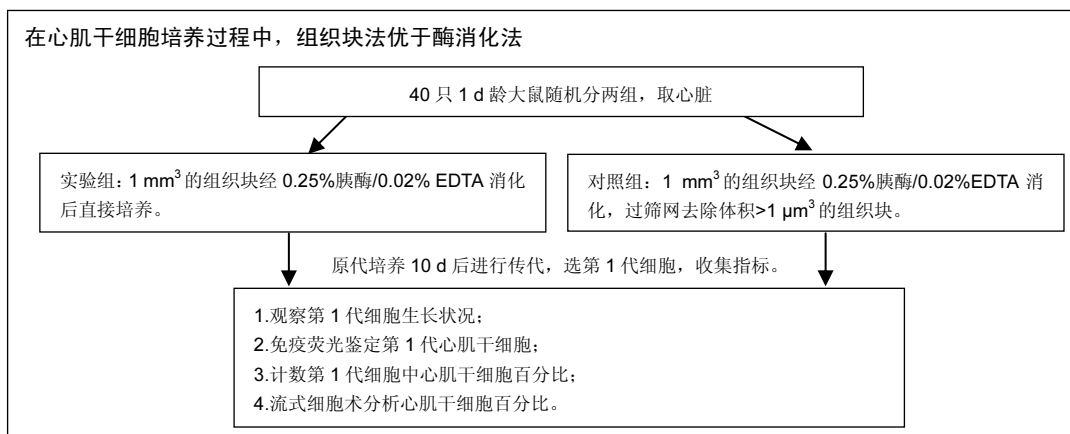
酶消化法和组织块法培养心肌干细胞的比较

李沙, 李树仁, 郝清卿, 杨玲玲, 张倩辉, 马玉龙, 张跃华, 邓文浩(河北医科大学附属河北省人民医院心内一科, 河北省石家庄市 050051)

引用本文: 李沙, 李树仁, 郝清卿, 杨玲玲, 张倩辉, 马玉龙, 张跃华, 邓文浩. 酶消化法和组织块法培养心肌干细胞的比较 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(50):7565-7570.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.50.017 ORCID: 0000-0002-0031-2819(李树仁)

文章快速阅读:



李沙, 女, 1986 年生, 河北省邯郸县人, 汉族, 河北医科大学在读硕士, 主要从事心血管病研究。

通讯作者: 李树仁, 博士, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 河北省人民医院心内一科, 河北省石家庄市 050051

中图分类号: R394.2

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2016)50-07565-06

稿件接受: 2016-10-17

文题释义:

心肌干细胞: 成年哺乳动物心脏内存在心肌干细胞巢, 在心房和心尖部位分布较多, 心肌干细胞除存在于心肌干细胞巢外, 也有少数分散在心肌中, 心脏受到损伤刺激后, 能够迅速向损伤部位迁移、分化产生心肌细胞。心肌干细胞的主要生物学特性包括: ①克隆能力; ②有多能性和能够自我更新; ③能够分化为成熟的心肌细胞、血管内皮细胞及平滑肌细胞等心脏结构细胞; ④可在损伤心肌局部激活、迁移。
免疫细胞化学: 又称免疫组织化学, 其主要原理是用标记的抗体或抗原对细胞相应抗原或抗体进行定性、定位或定量检测, 经过化学的呈色反应后, 用显微镜或电子显微镜观察。

摘要

背景: 目前国内动物研究中提取心肌干细胞方法不统一, 分离培养及提纯未形成规范化的流程。

目的: 探讨酶消化法和组织块法培养大鼠心肌干细胞的差异。

方法: 取清洁级 1 d 龄 SD 大鼠心脏组织, 分为组织块组与酶消化组, 分别使用酶消化法和组织块法体外培养心肌干细胞。

结果与结论: 酶消化法和组织块法均能培养出心肌干细胞, 但组织块组培养的细胞中心肌干细胞比例显著高于酶消化组。提示在心肌干细胞培养过程中, 组织块法优于酶消化法。

关键词:

干细胞; 培养; 心肌干细胞; 细胞培养; 免疫荧光; 流式细胞术; 免疫组化; C-kit⁺ 心肌干细胞; 河北省自然科学基金

主题词:

细胞培养技术; 心肌; 组织工程

基金资助:

河北省自然科学基金项目(G2015307019)

Enzyme digestion method versus tissue block method in the culture of cardiac stem cells

Li Sha, Li Shu-ren, Hao Qing-qing, Yang Ling-ling, Zhang Qian-hui, Ma Yu-long, Zhang Yue-hua, Deng Wen-hao (Department of Cardiology, Hebei General Hospital Affiliated to Hebei Medical University,

Li Sha, Studying for
master's degree,
Department of Cardiology,
Hebei General Hospital
Affiliated to Hebei Medical
University, Shijiazhuang
050051, Hebei Province,
China

Corresponding author:
Li Shu-ren, M.D.,
Professor, Chief physician,
Master's supervisor,
Department of Cardiology,
Hebei General Hospital,
Shijiazhuang 050051,
Hebei Province, China

Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: At present, various methods of extracting cardiac stem cells have been reported in China, but the processes of isolation, culture and purification are not yet standardized.

OBJECTIVE: To explore the difference in the culture of rat cardiac stem cells using enzyme digestion method and tissue block method.

METHODS: Cardiac stem cells from Sprague-Dawley rats, clean grade, 1 day of age, were extracted and cultured *in vitro* using the enzyme digestion method (control group) or tissue block method (experimental group).

RESULTS AND CONCLUSION: Both of the two methods could produce cardiac stem cells, but the proportion of cultured cells in the experimental group was significantly higher than that in the control group, indicating the tissue block method is superior to the enzyme digestion method in the culture of cardiac stem cells.

Subject headings: Cell Culture Techniques; Myocardium; Tissue Engineering

Funding: the Natural Science Foundation of Hebei Province, No. C2015307019

Cite this article: Li S, Li SR, Hao QQ, Yang LL, Zhang QH, Ma YL, Zhang YH, Deng WH. Enzyme digestion method versus tissue block method in the culture of cardiac stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(50):7565-7570.

0 引言 Introduction

心肌干细胞是一定条件下能够分化为各种心肌细胞的未分化细胞,且c-kit⁺细胞是心肌组织中含量最多的干细胞类型。近年来,心肌干细胞I期临床试验,二者均证实心肌干细胞移植治疗心肌梗死是安全可行的^[1-2],且急性心肌梗死患者在接受移植心肌干细胞后,心肌梗死面积减少、心功能得以改善,2年随访结束时,患者也未出现严重不良反应^[1]。与此同时Doppler等^[3]报道心肌干细胞的主要生物学特性包括克隆能力;能够分化为成熟的心肌细胞、血管内皮细胞及平滑肌细胞等心脏结构细胞。可见,心肌细胞为心肌梗死后缺血性心力衰竭的治疗开辟了新的途径。但是,目前国内动物研究中发现心肌干细胞提取方法不统一^[4-6],心脏中存在心肌干细胞数量极少,心肌干细胞的分离培养及提纯仍未形成规范化的流程^[7]。因此,找到一种能够简单高效获取心肌干细胞的方法显得尤为迫切。作者拟就心肌干细胞常用的组织块和酶消化培养法是否存在差别进行探讨。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照细胞学研究。

1.2 时间及地点 实验于2015年3月至2016年3月在河北医科大学附属河北省人民医院实验室完成。

1.3 材料

实验动物: 40只清洁级出生1 d龄SD大鼠,由河北医科大学动物中心提供,许可证号为SCXK(冀)2008-1-03。

主要试剂和仪器: IMDM培养基购自gibco公司;胎

牛血清购自wesent公司;青霉素、链霉素由河北省人民医院提供;胰蛋白酶购自北京索来宝公司;抗c-kit抗体购自abcam公司;DAPI溶液购自北京索来宝公司;FITC标记的链亲和素购自Life Technologies公司;100目不锈钢筛网购自上海易佰聚生物公司;生物安全柜购自Heal公司;倒置显微镜购自Olympus公司;荧光显微镜购自德国Leica公司);超净工作台购自日本Sanyo公司;5810R型台式多功能高速冷冻离心机购自Eppendorf AG公司;细胞培养箱购自德国Heraeus公司。

1.4 方法

1.4.1 组织块法 取清洁级1 d龄SD大鼠,皮肤消毒后直接开胸取心脏,含 1×10^5 U/L青霉素及100 mg/L链霉素的PBS洗2次,去除包膜及其他组织。眼科剪剪切至小于 1 mm^3 ,吸管反复吹打分散组织细胞,PBS洗2次,弃上清,加入无钙镁0.25%胰酶/0.02% EDTA,37 °C震荡消化10 min,1 000 r/min离心5 min。弃上清,加入含10%胎牛血清的IMDM培养液,37 °C、体积分数5%的CO₂、饱和湿度下培养。肉眼观察培养液颜色,每2或3 d更换培养液1次。倒置显微镜下每日观察细胞形态和贴壁生长^[8]。

1.4.2 酶消化法 将 1 mm^3 组织块0.25%胰酶/0.1%胶原酶消化离心后,加入含10%胎牛血清的IMDM,用100目不锈钢筛网过滤。细胞于37 °C、体积分数5%的CO₂、饱和湿度下孵育。肉眼观察培养液颜色,同时倒置显微镜下观察细胞贴壁情况,每两三天更换培养液1次^[9]。

1.4.3 心肌干细胞的传代培养 待细胞出现大量集落,

即可进行传代。在倒置相差显微镜下观察细胞生长状态, 当细胞培养至90%融合时, 弃培养液, PBS洗2次, 加入0.25%胰蛋白酶/0.02%EDTA消化, 显微镜下观察细胞由梭形变为圆形, 立即加入等量含10%胎牛血清的IMDM培养液终止消化, 收集单细胞悬液, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清液, 加10 mL含10%胎牛血清的IMDM培养液重悬细胞, 按1:2传代, 培养条件与原代培养相同。37℃、体积分数5%的CO₂的孵箱中培养, 每2 d或3 d换培养液1次。

1.4.4 c-kit⁺心肌干细胞的鉴定及计算c-kit⁺心肌干细胞百分比 分别选取组织块和酶消化法第1代传代培养的细胞接种到接种于24孔板。48 h后取出已经贴壁形成单层细胞的玻片进行免疫荧光标记。40 g/L多聚甲醛室温固定1 h, 0.5% Triton X-100/PBS漂洗5 min×3次, 体积分数5%牛血清白蛋白室温封闭1 h后加入1:100稀释的抗c-kit抗体, 湿盒内室温孵育2 h, 0.5% TritonX-100/PBS漂洗5 min×3次, 加入1:500稀释的Streptavidin FITC Conjugate, 避光室温孵育1 h; 1:1 000的DAPI复染5 min, PBS漂洗5 min×3次, 甘油封固, 荧光显微镜观察, 计算心肌干细胞的百分比, 按照单位面积中c-kit⁺心肌干细胞百分比=c-kit⁺心肌干细胞/细胞总数×100%, 样本为20个培养孔, 每孔计数4处视野, 每个视野设定计数面积50 μm², 取平均值^[10]。

1.4.5 流式细胞术计算c-kit⁺心肌干细胞百分比 细胞用0.25%的胰酶消化, PBS洗, PBS重悬, 加入体积分数2%胎牛血清的PBS封闭1 h, 每1×10⁶个细胞加1 μL抗c-kit抗体(1:100)室温孵育20–60 min, PBS洗, 离心, 弃上清液, PBS重悬, 再加入按1:500稀释的Streptavidin FITC Conjugate混匀, 暗室室温下反应30 min, PBS洗, PBS重悬, 流式细胞仪检测, 收集提纯的c-kit⁺心肌干细胞。

1.5 主要观察指标 ①细胞的生长情况及形态; ②c-kit⁺心肌干细胞的鉴定; ③心肌干细胞传代培养后的生长状况及形态; ④c-kit⁺心肌干细胞百分比。

1.6 统计学分析 采用SPSS 13.0软件进行统计学分析。组间比较采用*T*检验, *P* < 0.05为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 不同分离培养方法细胞的生长情况及形态 倒置显微镜下可见, 组织块法培养的细胞贴壁晚, 接种两三天后可见单细胞散在贴壁, 组织块初期仍游离在培养液中, 四五天后开始贴壁, 随后成纤维样细胞和多

角形不规则细胞爬出; 七八天后圆形、体积小、折光性强的细胞开始爬出。酶消化组单细胞贴壁早, 两三天后可见部分细胞散在贴壁, 并可见散在圆形、体积小、折光性强的细胞贴壁生长, 胞核较大, 核明显; 四五天后细胞贴壁增多明显, 大量不规则多角形细胞, 散在少量圆形、体积小、折光性强的细胞; 10 d后90%以上细胞已贴壁融合, 出现散在及部分成簇的体积小、圆形及折光性强的细胞贴壁生长, 其中部分小圆亮细胞可见双核。2种方法获得的细胞均能在原代培养中良好生长(图1)。

2.2 c-kit⁺心肌干细胞的鉴定结果 2种方法培养的细胞, 在荧光显微镜下, 均可见c-kit阳性的心肌干细胞(图2)。

2.3 心肌干细胞传代培养后的生长状况及形态 第1代细胞24 h即开始贴壁, 六七天时细胞80%–90%贴壁融合。倒置显微镜下可见体积小、圆形及折光性强的细胞(图3)。

2.4 传代培养后c-kit⁺心肌干细胞的百分比 免疫细胞化学检测结果显示, 组织块组心肌干细胞百分比显著高于酶消化组[(13.29±1.87)% vs. (8.14±1.13)%, *P* < 0.05]。流式细胞术检测结果同样显示, 组织块法培养的细胞中心肌干细胞含量明显高于酶消化组(13.0% vs. 9.8%, *P* < 0.05)。

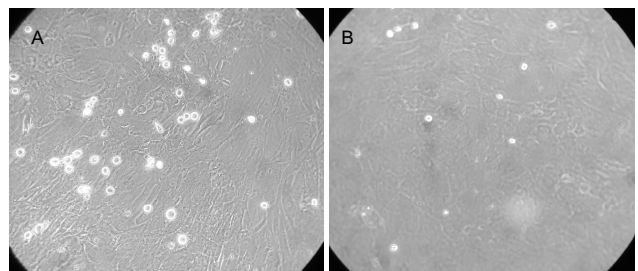


图3 心肌细胞的传代培养(×20)

Figure 3 Subculture of cardiac stem cells (×20)

图注: 图中A为组织块法培养的细胞传代培养第1代的形态; B为酶消化法培养的细胞传代培养第1代的形态。

3 讨论 Discussion

成体心肌干细胞的细胞膜上能够表达一种或多种干细胞相关抗原, 如干细胞因子受体(C-kit⁺)、P-糖蛋白(MDR⁺)和干细胞抗原1(Sca-1⁺)等多能干细胞表面标记物, 同时谱系标志物阴性, 且在一定条件下能够分化为各种心肌细胞的未分化细胞^[11], 组织来源十分广泛, 具有很强的可塑性^[12]。心脏中的成体心肌干细胞主要分化为心肌细胞, 也可分化为血管内皮细胞及平滑肌细胞。c-kit⁺细

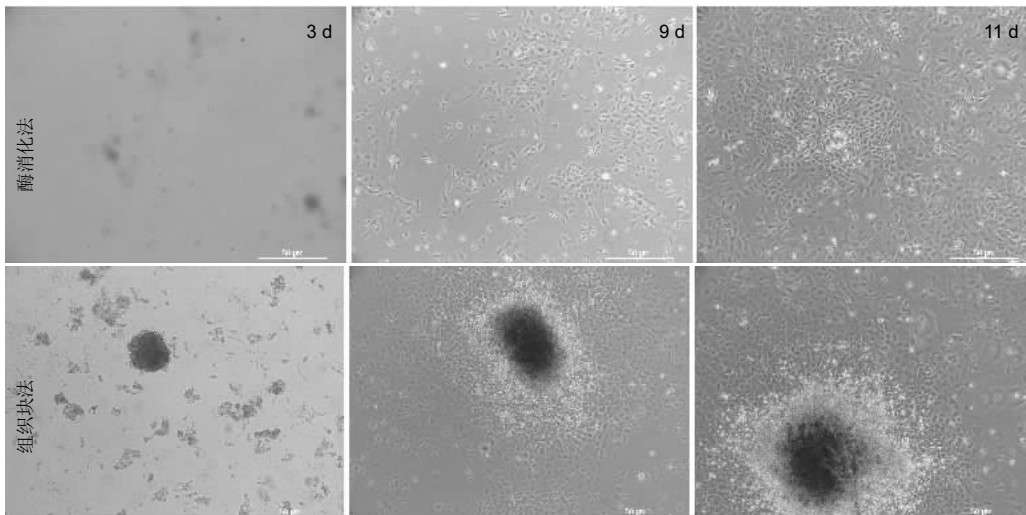


图1 原代培养细胞的形态($\times 10$)

Figure 1 Morphology of primary cultured cardiac stem cells ($\times 10$)

图注: 酶消化法及组织块法获得的心肌干细胞均能良好生长。

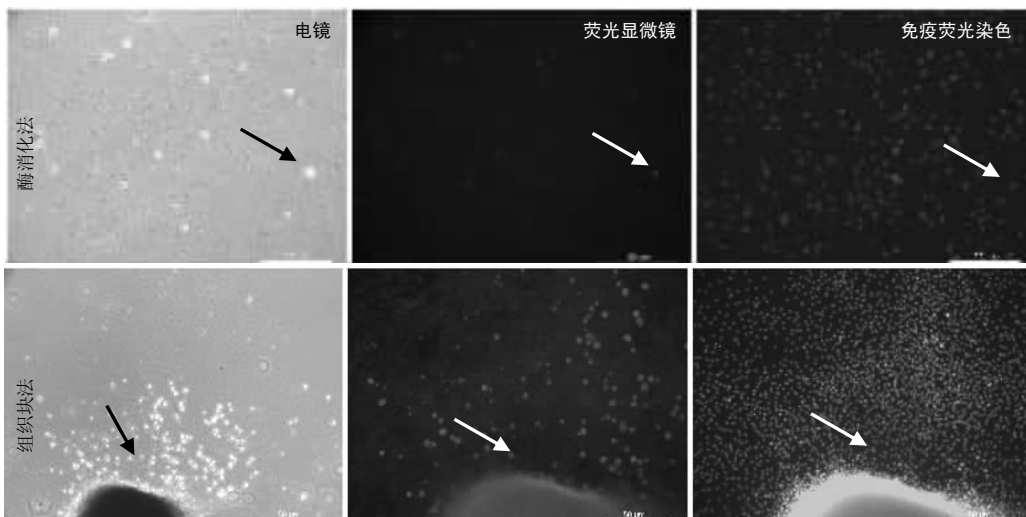


图2 心肌干细胞的鉴定($\times 10$)

Figure 2 Identification of cardiac stem cells ($\times 10$)

图注: 酶消化法及组织块法均可获得 c-kit 阳性的心肌干细胞。箭头指示 c-kit 阳性心肌细胞。

胞是心肌组织中含量最多的干细胞类型。Beltrami 等^[13]将 c-kit⁺细胞植入大鼠心肌梗死部位 10 d 后发现, c-kit⁺细胞分化为成熟的心肌细胞, 表达心肌特异性肌球蛋白重链、心肌横纹蛋白等, 梗死区血管密度增加, 心功能改善。

目前人们已经发现 7 种心肌干细胞, c-kit⁺是研究最多的一种, 其在心肌梗死和心衰后心脏的修复中均能起到重要最用^[14-19]。一些研究质疑 c-kit⁺细胞是否是心肌干细胞, 原因是所有共表达的 CD45 的 c-kit⁺细胞均可被 tryptase 染色, 而 tryptase 是肥大细胞的特异性标志物^[20-25]。然而, 其他研究者利用 CD45 将 c-kit⁺细胞分为两群, c-kit⁺/CD45⁺为肥大细胞, 而 c-kit⁺/CD45⁻为干细胞。心脏干细胞异体移植治疗心肌梗死存在伦理问题, 但其具有很好的临床治疗前景。例如心脏干细胞移植, 可以使移植的心脏干细胞适应心肌梗死区域复杂的微环境, 有望使心脏干细胞在缺氧区域得到长期存活, 进而修复梗死心脏的心功能。

体外培养分离的细胞, 需要提供其生存的营养条件

和营养环境, 因此选择细胞赖以生存的培养液至关重要。以往的研究中, 常将培养液的选择作为重点, 添加多种细胞因子, 如白血病抑制因子、碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子等, 用以促进目的细胞的生长分裂^[26]。实验旨在寻找出一种培养心脏干细胞的最简单优化的方法, 并希望不添加任何细胞因子, 所以最终拟定的全培养液配方为 IMDM 培养基、体积分数 20%胎牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素, 可满足心脏干细胞最基本的生长需求。

胰蛋白酶是目前应用最广泛的组织消化分离试剂, 关于胰蛋白酶的浓度各家报告不一, 从 0.05%–0.5% 不等。EDTA 作用较胰蛋白酶缓和, 胰蛋白酶联合使用 EDTA, 能提高消化效果, EDTA 工作液浓度常为 0.02%, 消化酶消化组织时的温度以 35–37 °C 为宜, 作者选定的消化液为 0.25%胰酶和 0.02%EDTA 组合, 在实验中发现, 胰蛋白酶浓度低、消化时间短时无法获得单细胞, 加大浓度时又会导致细胞存活率低, 降低细胞生存率。实验中胰蛋白

酶的作用情况是在 37 °C 消化 10 min, 这是在多次实验中摸索出来的对于胰蛋白酶消化的最佳作用时间。流式细胞术是一种对悬液中的单个细胞或细胞器粒子等进行快速测量并自动化分析的技术^[27-34], 可以识别并筛选出细胞悬液中带有荧光标记的目的细胞^[35]。作者采用心脏干细胞表面的 CD117 进行荧光标记。

实验结果显示, 组织块法培养的细胞中心肌干细胞含量高于酶消化法培养的细胞, 原因尚未明确, 初步考虑: 一方面组织块法未使用细胞滤网, 组织块与单细胞悬液共同培养, 细胞数量上远高于酶消化法, 有较多促进干细胞增殖的细胞因子, 另一方面经酶消化的单细胞悬液, 细胞膜有一定损伤, 细胞活性降低, 而保留下来的组织块却较好的好存了细胞的完整性, 在原代培养过程中, 活性较好的心肌干细胞从组织块周围爬出。组织块法培养细胞至于组织块中是否存在一定量促进心肌干细胞生长增殖的细胞因子或者其他机制发挥作用, 实验未予验证, 有待进一步研究。

鉴于以往的研究对于心脏干细胞的培养方法及鉴定标准并不一致, 得出的结论缺乏一致的可比性。同时获取的方法过于复杂繁琐, 难以提纯都成为限制心肌干细胞动物实验及临床应用的阻碍。实验利用 0.25% 胰酶和 0.02% EDTA 组合消化心肌组织后, 用全培养液培养心肌干细胞, 利用 c-kit⁺ 心肌干细胞进行荧光标记, 最后进行流式细胞提纯, 寻找出一种简便高效的培养心肌干细胞的方法。心肌干细胞作为种子细胞, 为进一步探讨心肌干细胞纯化及增殖提供了一定的实验基础, 为更多探索心肌干细胞特性及生理功能的科学研究奠定细胞学基础。

作者贡献: 李树仁进行实验设计, 实验实施为李沙, 实验评估为杨玲玲, 资料收集为马玉龙, 郝清卿负责数据收集及结果分析, 张跃华成文, 邓文浩和张倩辉审核。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 试验方案经河北医科大学附属河北省人民医院动物实验伦理委员会批准。实验动物在戊巴妥钠麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 李树仁对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2011;378(9806):1847-1857.
- [2] Makkar RR, Smith RR, Cheng K, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2012;379(9819):895-904.
- [3] Doppler SA, Deutsch MA, Lange R, et al. Cardiac regeneration: current therapies-future concepts. *J Thorac Dis*. 2013;5(5):683-697.
- [4] 陆东风, 吴昊, 黄璟, 等. 新生 SD 大鼠心肌干细胞的体外分离培养与鉴定[J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(11):1629-1632.
- [5] 郝军荣, 张丽, 秦正红. 神经干细胞球和单层贴壁神经干细胞的培养及鉴定[J]. 神经药理学报, 2011(1):51-55.
- [6] 李梅, 王湘臻, 徐铁军. 海马神经干细胞不同传代方法的比较[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(6):985-989.
- [7] Golden HB, Gollapudi D, Gerilechaogetu F, et al. Isolation of cardiac myocytes and fibroblasts from neonatal rat pups. *Methods Mol Biol*. 2012;843:205-214.
- [8] 胡圣大, 马根山, 姚玉宇, 等. 人心肌干细胞的体外改良培养[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(2):381-384.
- [9] 何璐. 大鼠心肌干细胞的分离培养与鉴定及鹿茸多肽对其分化的诱导作用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [10] 姬婷婷, 徐岩, 张建华, 等. 新生 SD 大鼠心肌细胞的原代培养及荧光鉴定[J]. 安徽医科大学学报, 2014(1):120-122.
- [11] Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev*. 2005;85(4):1373-1416.
- [12] Nam YJ, Song K, Olson EN. Heart repair by cardiac reprogramming. *Nat Med*. 2013;19(4):413-415.
- [13] Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114(6):763-776.
- [14] Wang X, Hu Q, Nakamura Y, et al. The role of the sca-1+/CD31- cardiac progenitor cell population in postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells*. 2006;24(7):1779-1788.

- [15] Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, et al. Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2004;279(12):11384-11391.
- [16] Mouquet F, Pfister O, Jain M, et al. Restoration of cardiac progenitor cells after myocardial infarction by self-proliferation and selective homing of bone marrow-derived stem cells. *Circ Res*. 2005;97(11):1090-1092.
- [17] Xaymardan M, Tang L, Zagreda L, et al. Platelet-derived growth factor-AB promotes the generation of adult bone marrow-derived cardiac myocytes. *Circ Res*. 2004;94(5):E39-45.
- [18] Pfister O, Mouquet F, Jain M, et al. CD31⁺ but Not CD31⁻ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation. *Circ Res*. 2005;97(1):52-61.
- [19] Yamada Y, Yokoyama S, Wang XD, et al. Cardiac stem cells in brown adipose tissue express CD133 and induce bone marrow nonhematopoietic cells to differentiate into cardiomyocytes. *Stem Cells*. 2007;25(5):1326-1333.
- [20] Moretti A, Caron L, Nakano A, et al. Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell*. 2006;127(6):1151-1165.
- [21] Bu L, Jiang X, Martin-Puig S, et al. Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. *Nature*. 2009;460(7251):113-117.
- [22] Wu SM, Fujiwara Y, Cibulsky SM, et al. Developmental origin of a bipotential myocardial and smooth muscle cell precursor in the mammalian heart. *Cell*. 2006;127(6):1137-1150.
- [23] Moretti A, Bellin M, Jung CB, et al. Mouse and human induced pluripotent stem cells as a source for multipotent Isl1+ cardiovascular progenitors. *FASEB J*. 2010;24(3):700-711.
- [24] Cai CL, Liang X, Shi Y, et al. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell*. 2003;5(6):877-889.
- [25] Kattman SJ, Huber TL, Keller GM. Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev Cell*. 2006;11(5):723-732.
- [26] 徐富翠,邹礼乐,梅欣明,等.神经干细胞培养及其影响因素[J].中国组织工程研究,2013,17(10):1835-1840.
- [27] Barat D, Benazzi G, Mowlem MC, et al. Design, simulation and characterisation of integrated optics for a microfabricated flow cytometer. *Opt Commun*. 2010;283(9):1987-1992.
- [28] Joo S, Kim KH, Kim HC, et al. A portable microfluidic flow cytometer based on simultaneous detection of impedance and fluorescence. *Biosens Bioelectron*. 2010;25(6):1509-1515.
- [29] Kamei T. Miniaturized and integrated fluorescence detectors for microfluidic capillary electrophoresis devices. *Methods Mol Biol*. 2009;503:361-374.
- [30] Irawan R, Tjin SC. Detection of fluorescence generated in microfluidic channel using in-fiber grooves and in-fiber microchannel sensors. *Methods Mol Biol*. 2009;503:403-422.
- [31] Narakathu BB, Atashbar MZ, Bejcek BE. Improved detection limits of toxic biochemical species based on impedance measurements in electrochemical biosensors. *Biosens Bioelectron*. 2010;26(2):923-928.
- [32] Segerink LI, Sprengels AJ, ter Braak PM, et al. On-chip determination of spermatozoa concentration using electrical impedance measurements. *Lab Chip*. 2010;10(8):1018-1024.
- [33] Schultz E, Galland R, Du Bouëtiez D, et al. A novel fluorescence-based array biosensor: principle and application to DNA hybridization assays. *Biosens Bioelectron*. 2008;23(7):987-994.
- [34] Mishra NN, Retterer S, Zieziulewicz TJ, et al. On-chip micro-biosensor for the detection of human CD4(+) cells based on AC impedance and optical analysis. *Biosens Bioelectron*. 2005;21(5):696-704.
- [35] 赵书涛,武晓东,王策,等.流式细胞仪的原理、应用及最新进展[J].现代生物医学进展,2011,11(22):4378-4381.