

微流控人体器官芯片在癌症研究中的应用进展

吴思怡 综述, 宋启斌 审校

(武汉大学人民医院肿瘤中心, 湖北 武汉 430060)

摘要:近年来微流体细胞培养技术快速发展,进而推动了器官芯片模型的建立。器官芯片模型可以更好的重现人体癌症模型,能更好的研究癌症机制,从而为癌症临床疗法提供新思路。全文介绍器官芯片技术的基本原理,器官芯片用于培养细胞、模拟血管生长、模拟肿瘤转移的功能,以及器官芯片技术发展所面临的挑战与困难,并总结器官芯片的优缺点。

关键词:器官芯片;微流体;癌症模型;癌症疗法

中图分类号:R73-35 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-170X(2020)08-0737-05

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2020.08.B015

Modelling Cancer in Microfluidic Human Organs-on-chips

WU Si-yi, SONG Qi-bin

(Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract: One of the problems in the development of new anticancer therapies is the lack of pre-clinical models that can identify key molecular, cellular and biophysical features of human cancer progression. In this article, we review the recent developments in microfluidic cell culture technique, i.e. human organs-on-chips (also known as organ chips) that are used to model cancer cell behaviors in tissue and organ microenvironments in vitro. The advantages and disadvantages of organ chip models and the challenges to meet the needs of cancer researchers, drug developers and clinicians in personalized medicine are discussed.

Subject words: organs-on-chips; microfluidic; cancer models; cancer therapies

目前,研究者尚缺乏完善的癌症细胞及生物预临床模型,从而一定程度上延缓了新型抗肿瘤治疗手段的发展。肿瘤微环境是一个十分复杂的体系,而大部分体外癌症模型无法准确还原肿瘤形成部位的组织及器官微环境。与在常规 2D 基质上培养细胞相比,研究者们已经研发了更多更为复杂的体外癌症模型,包括在 transwell 细胞培养、球状体和类器官培养等,以期更好地模拟正常组织和癌组织的发育,但这些模型依旧存在一定的缺陷。器官芯片目前被用于模拟人体相关组织和体外器官微环境中的癌细胞行为。通过器官芯片,实验员能够控制一个或多个细胞的分子、化学和生物物理参数,还可以分析这

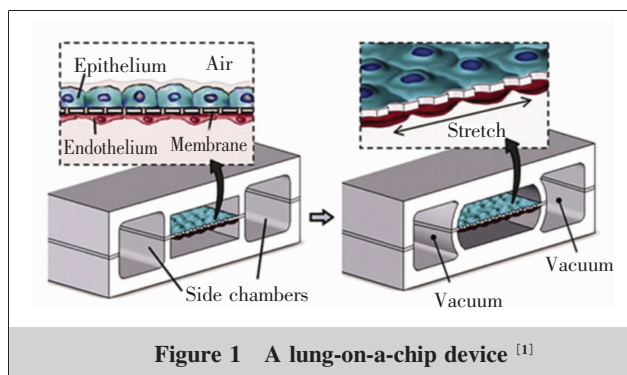
些因素如何促进癌症形成和进展等。

1 器官芯片技术

器官芯片是由光学透明的材料、玻璃或柔性聚合物(如:聚二甲基硅氧烷 Poly dimethyl siloxane, PDMS)组成的微流体细胞培养装置(Figure 1)^[1]。此装置内有由活细胞填充灌注的中空微通道,并通过体外重建组织和器官水平结构及功能来重现体内器官水平生理学及病理生理学^[2]。它们之所以被称为“芯片”,是因为它们最初是用计算机微芯片制造方法改编制成的^[3]。微流体装置可用于制作“组织芯片”,其中单个通道由同种组织细胞排列组成。微流体装置也可用于创建更为复杂的器官芯片,它结合了两种或更多组织类型,这些组织可直接跨越多孔

通信作者:宋启斌,主任医师,博士生导师,博士;武汉大学人民医院肿瘤中心,湖北省武汉市武昌区张之洞路 99 号(430060); E-mail: qibinsong@whu.edu.cn

收稿日期:2019-08-27; **修回日期:**2019-11-19



细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 涂覆膜或经填充了 ECM 凝胶的微通道分离。培养基流过内皮的血管通道或实质通道, 这样可以在长时间 (数周至数月) 内维持细胞活力^[2]。此外, 当器官芯片由培养基供养时, 培养基可用全血替换, 可用于数小时的培养^[4,5]。复杂的器官芯片可以模拟组织-组织界面, 这对于重建器官水平结构和功能至关重要^[6,7]。这种芯片由实质和微血管通道组成, 它们之间的多孔 ECM 涂覆膜起分隔作用。膜的一侧有器官特异性上皮细胞, 另一侧有基质细胞 (例如, 内皮细胞、成纤维细胞或免疫细胞), 细胞在涂覆膜表面生长, 形成基底膜。由于使用的是多孔 ECM, 基底膜可以跨越这些孔, 细胞可以充分延伸, 并且与相邻组织接触^[8]。这些装置内还有中空侧室, 可以复制气液界面 (Air-liquid interface, ALIs)。可以通过中空侧室施加循环抽吸, 从而有节奏的拉伸和放松器官组织界面, 从而模仿器官的机械运动。

器官芯片涵盖了多细胞结构、组织间界面、化学梯度、机械运动和血管灌注, 这是传统 2D 和 3D 培养系统达不到的。现在科学家们已经研发出很多器官芯片微器件, 其再现了许多人体器官 (包括肺泡^[9-11]和细支气管^[12-14]、肾小管^[15-16]和肾小球^[8,17]、小肠^[18-19]、肝^[20-22]、骨髓^[23]和血脑屏障 (BBB)^[24-26]的关键功能单元结构、功能和机械性特性。重要的是, 这些器官芯片微流体装置可以再现器官对药物^[6]、毒素^[12]、辐射^[13]、香烟^[12]、病原体^[12]和正常微生物^[12]的器官水平反应, 以及体外循环免疫细胞和器官特异性炎症反应的流动依赖性募集^[10,12,27]。器官芯片还可以模拟许多类型的器官特异性疾病状态, 包括 Barth 综合征^[29]、肺水肿^[10]、血栓形成^[5]、哮喘^[13]、慢性阻塞性肺病^[13]、炎症性肠病^[27]。因此, 药物开发与新疗法的研究中, 已经有这些装置的身影了。

2 芯片上模拟癌症模型

微流体细胞培养技术主要用于模拟癌症发生发展中的特定步骤, 包括肿瘤细胞生长和增殖、血管生成、细胞侵袭和转移。

2.1 芯片上肿瘤细胞的生长与增殖

器官芯片模型已用于确定正常实质细胞 (例如, 上皮细胞、内皮细胞、基质细胞和免疫细胞) 和局部组织微环境中的 ECM 如何影响各种癌症生长。将 T47D 人乳腺癌细胞与永生化人乳腺成纤维细胞 (human mammary fibroblasts, HMF) 共同培养, 并与微流体装置中各种 ECM 组分组合, 进而得出了 HMF 可以促进乳腺癌细胞增长, 在富含纤连蛋白的 ECM 中促进作用更显著^[30]。肿瘤细胞中雌激素受体- α (Estrogen receptor α , ER α) 的表达是激素反应性肿瘤的一个决定性特征, 并在临床中用作激素治疗的检测指标。由于转移性肿瘤与原发性肿瘤所处的微环境不同, 因此 ER α 表达与肿瘤细胞生长刺激之间的相关性尚未确定。利用微流体装置模拟乳腺癌细胞与相关基质微环境之间的相互作用, 得到了先前未得出的实验结果, 揭示了乳腺癌细胞的生长与 ER α 蛋白质下调的相关性^[31]。

另一项研究发现, 人类非小细胞肺癌 (non-small cell lung carcinoma, NSCLC) 细胞的生长速度取决于正常肺泡上皮细胞和肺内皮细胞产生的局部微环境因子。这些细胞通过多孔 ECM 涂层膜相接, 并在肺泡芯片上的 ALI 下培养; 当使用相同培养基在标准塑料培养皿上单独培养时, 癌细胞不能生长^[6]。且在这个肺癌芯片中, 即使内皮细胞的分泌因子抑制肿瘤生长, 来自健康肺泡上皮的条件下培养基足以促进癌细胞增殖。而且, 当通过对装置的中空侧室施加循环抽吸以模拟生理呼吸运动时, 即在肺泡芯片的肺泡-毛细血管界面上施加循环应变时, 癌症生长也会被抑制。研究发现, 这一结果是由上皮生长因子受体 (epithelial growth factor receptor, EGFR) 磷酸化介导的, 这也导致其对第三代酪氨酸激酶抑制剂 Rociletinib 的抗性增加。如果不使用这种器官芯片技术, 就无法确定这些反应。这可能解释了为什么那些进展快速且对肺泡运动造成影响的肺癌会对治疗起反应, 以及, 为什么微小残留病变癌症患者和肺功能修复癌症患者对治疗的抵抗性很高^[6]。上述研究

是微流体用于阐明多种癌相关细胞与局部组织微环境之间复杂相互作用的较好例子。

2.2 芯片上新生血管

血管生成是癌症发展中的关键步骤,因为前体病变从增生发展到瘤形成需要新血管形成^[32],因此这是限制癌症进展的重要因素。目前已经研发出多种微流体血管生成模型,它们可以运用工程化微血管在体外重建毛细管和血管^[33-38]。

胶质母细胞瘤的体外模型经常被用于研究脑肿瘤细胞-内皮细胞相互作用。通过微流体装置内的微柱分区分离不同类型的细胞,这样,可以进行生化通信,同时细胞也能应答于信号而迁移。例如,人脐带血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)和恶性人 U87MG 成胶质细胞瘤细胞在微流体装置内的中心纤维蛋白凝胶填充通道的相对侧共培养^[39]。结果显示,在具有癌细胞的装置中培养的 HUVEC 比没有癌细胞的初始生长更快,这可能是由肿瘤细胞分泌的因子引起的。无论装置中有没有癌细胞, HUVEC 的持续生长情况相似;然而,当与癌细胞共同培养时,由内皮细胞形成的微血管会更频繁的分支,在相邻细胞之间具有非典型融合,其特征类似于在体内肿瘤微血管系统中观察到的特征^[39]。

2.3 癌细胞的转移和侵袭

由于肿瘤转移会使患者的预后恶化,理解原发性肿瘤转移的机制有一定帮助^[40]。转移是一个复杂的多步骤过程,首先,癌细胞获得了穿过基底膜入侵的能力,该基底膜的功能是将上皮细胞与下面的基质分开。然后,这些侵袭性癌细胞必须通过间质 ECM 迁移并渗入毛细血管或淋巴管中以扩散到远处。这些转移细胞必须通过血流或淋巴循环存活并附着在远处的内皮上,然后从血管中渗出并植入另一器官的间质中以建立新的转移性肿瘤。

微流体培养技术的使用揭示了不同细胞在肿瘤细胞迁移和侵袭中的作用。例如,当原代人巨噬细胞与微流体装置中的人 MDA-MB-231 乳腺癌或 PC3 前列腺肿瘤细胞或 MDA-MB-435S 黑素瘤细胞共培养时,由这些免疫细胞分泌的细胞因子增加了癌细胞迁移速度和持久性^[41]。当使用两室器官芯片进行研究时,其中一个由前列腺癌细胞组成,另一个由正常成纤维细胞或癌症相关成纤维细胞(cancer associated fibroblast, CAF)组成,研究发现,具有 CAF 的芯片增加了纤连蛋白原纤维排列,这就为癌细胞定

向迁移提供了路径^[42]。

3 微流体模型对癌症疗法的反应

许多研究小组已经使用微流体培养装置来分析微环境因素如何影响肿瘤细胞对抗癌疗法的反应。在微流体装置内产生梯度氧浓度, A549 肺泡上皮癌细胞暴露于抗癌药物替拉扎明中,低氧情况下检测到药物诱导的癌细胞杀伤增加^[43]。该研究说明如何使用微流体技术精确控制化学(例如氧气)浓度梯度,以获得对癌症生长控制和治疗靶向的新见解。

在另一项研究中,将肺癌细胞系和基质细胞系混合,或将来自新鲜肺癌组织的细胞在微流体装置内的 3D 凝胶中培养,并暴露于芯片产生的不同浓度的抗癌药物上^[44]。使用该装置,可以平行测定不同抗癌药物的敏感性,也可以确定 8 例患者对于一或多种药物(靶向 EGFR 抑制剂吉非替尼或更广谱化疗药顺铂)的最优药物浓度。这提示能将器官芯片技术应用于个性化医疗^[44]。

综上,这些发现表明,微流体器官芯片技术可用于筛选新型抗癌分子,细胞和基于纳米技术的疗法,优化治疗参数和研究组合疗法^[45]。

4 器官芯片的利弊

微流体模型比传统模型有着更大的优势,对于研究新血管形成,肿瘤的侵袭和癌细胞转移尤为重要。模拟体内器官的生理学或病理生理学行为是开发器官芯片的关键。只有证明它们能有效地模拟体内的癌症行为和药物反应,才能说明芯片模型是有效的。器官芯片是一个全新的领域,研究人员还需要在开始研究之前考虑他们想要建模的病理生理过程。

然而,器官芯片比许多其他 3D 培养系统更难使用。技术稳健性也是一个挑战,只有各种因素完美配合,才能满足复杂的微流体系统,诸如气泡形成这种简单因素都可能破坏实验。对于长期研究,维持多种组织和细胞的活力、功能以及结构完整也是一个挑战。这需要运用微设施制造和工程知识,来设计微流体试验的设备。尽管癌症器官芯片需要更多的投入,但它能更好的模拟人类癌症的病理生理学,有巨大的价值。

5 展 望

与现有动物模型相比,人类癌症器官芯片可以更好的预测临床试验结果,从而推动了癌症药物的开发^[10]。在候选药物进入临床试验前,用器官芯片测试抗癌药物可以更好的了解药物作用和毒性分子机制。普通器官芯片还可用于平行研究,用以确定在临床前动物模型中未观察到但在临床试验期间出现毒性的机制。

癌器官芯片还可以提升个性化医疗水平,因为它可以更好的重现患者的特异性。它可以从器官水平,癌症病理生理学水平反应患者对治疗的应答。基于流体耦合多个人体器官芯片方面的进展,我们还可以开始创建癌症转移性扩散的多器官模型。然而,这仍然存在着许多挑战,包括克服多个器官芯片之间的培养基不相容问题,以及如何设计实验以确保在不同时间内各个器官可以达到最佳的特异性分化程度,等等。随着器官芯片技术的进步,研究者可以通过本文上述器官芯片技术,达到复刻人体癌症模型的目的,进而为临床癌症治疗提供帮助。

参考文献:

- [1] Huh D, Matthews BD, Mammoto A, et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip[J]. Science, 2010, 328(5986): 1662–1668.
- [2] Bhatia SN, Ingber DE. Microfluidic organ-on-chips[J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(8): 760–772.
- [3] Novak R, Dildier M, Calamari E, et al. Scalable fabrication of stretchable, dual channel, microfluidic organ chips[J]. J Vis Exp, 2018, 20: 140.
- [4] Jain A, Barrile R, van der Meer AD, et al. Primary human lung alveolus-on-a-chip model of intravascular thrombosis for assessment of therapeutics [J]. Clin Pharmacol Ther, 2018, 103(2): 332–340.
- [5] Barrile R, van der Meer AD, Park H, et al. Organ-on-chip recapitulates thrombosis induced by an anti-cd154 monoclonal antibody; translational potential of advanced microengineered systems[J]. Clin Pharmacol Ther, 2018, 104(6): 1240–1248.
- [6] Hassell BA, Goyal G, Lee E, et al. Human organ chip models recapitulate orthotopic lung cancer growth, therapeutic responses, and tumor dormancy in vitro [J]. Cell Rep, 2017, 21(2): 508–516.
- [7] Choi Y, Hyun E, Seo J, et al. A microengineered pathological model of early-stage breast cancer [J]. Lab Chip, 2015, 15(16): 3350–3357.
- [8] Musah S, Mammoto A, Ferrante TC, et al. Mature induced-luripotent-stem-cell-derived human podocytes reconstitute kidney glomerular-capillary-wall function on a chip[J]. Nat Biomed Eng, 2017, 5: 0069.
- [9] Huh D, Matthews BD, Mammoto A, et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip [J]. Science, 2010, 328(5986): 1662–1668.
- [10] Huh D, Leslie DC, Matthews BD, et al. A human disease model of drug toxicity induced pulmonary edema in a lung-on-a-chip microdevice [J]. Sci Transl Med, 2012, 4(159): 159.
- [11] Stucki AO, Stucki JD, Hall SR, et al. A lung-on-a-chip array with an integrated bio-inspired respiration mechanism [J]. Lab Chip, 2015, 15(5): 1302–1310.
- [12] Benam KH, Villenave R, Lucchesi C, et al. Small airway-on-a-chip enables analysis of human lung inflammation and drug responses in vitro [J]. Nat Methods, 2016, 13(2): 151–157.
- [13] Benam KH, Novak R, Nawroth J, et al. Matched-comparative modeling of normal and diseased human airway responses using a microengineered breathing lung chip[J]. Cell Syst, 2016, 3(5): 456–466.
- [14] Sellgren KL, Butala EJ, Gilmour BP, et al. A biomimetic multicellular model of the airways using primary human cells[J]. Lab Chip, 2014, 14(17): 3349–3358.
- [15] Jang KJ, Mehr AP, Hamilton GA, et al. Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment [J]. Integr Biol (Camb), 2013, 5(9): 1119–1129.
- [16] Maschmeyer I, Lorenz AK, Schimek K, et al. A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents [J]. Lab Chip, 2015, 15(12): 2688–2699.
- [17] Musah S, Dimitrakakis N, Camacho DM, et al. Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells into mature kidney podocytes and establishment of a glomerulus chip[J]. Nat Protoc, 2018, 13(7): 1662–1685.
- [18] Kim HJ, Ingber DE. Gut-on-a-chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation[J]. Integr Biol (Camb), 2013, 5(9): 1130–1140.
- [19] Kasendra M, Tovaglieri A, Sontheimer-Phelps A, et al. Development of a primary human small intestine-on-a-chip using biopsy-derived organoids [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2871.
- [20] Esch MB, Mahler GJ, Stokol T, et al. Body-on-a-chip simulation with gastrointestinal tract and liver tissues suggests

- that ingested nanoparticles have the potential to cause liver injury[J]. *Lab Chip*, 2014, 14(16):3081–3092.
- [21] Li CY, Stevens KR, Schwartz RE, et al. Micropatterned cell-cell interactions enable functional encapsulation of primary hepatocytes in hydrogel microtissues [J]. *Tissue Eng Part A*, 2014, 20(15–16):2200–2212.
- [22] Beckwitt CH, Clark AM, Wheeler S, et al. Liver ‘organ on a chip’[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 363(1):15–25.
- [23] Sieber S, Wirth L, Cavak N, et al. Bone marrow-on-a-chip: long-term culture of human haematopoietic stem cells in a three-dimensional microfluidic environment [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018, 12(2):479–489.
- [24] Herland A, van der Meer AD, Fitz Gerald EA, et al. Distinct contributions of astrocytes and pericytes to neuroinflammation identified in a 3D human blood-brain barrier on a chip[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3):1–21.
- [25] Adriani G, Ma D, Pavesi A, et al. A 3D neurovascular microfluidic model consisting of neurons, astrocytes and cerebral endothelial cells as a blood-brain barrier[J]. *Lab Chip*, 2017, 17(3):448–459.
- [26] Wang YI, Abaci HE, Shuler ML. Microfluidic blood-brain barrier model provides in vivo-like barrier properties for drug permeability screening [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(1):184–194.
- [27] Kim HJ, Li H, Collins JJ, et al. Contributions of microbiome and mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human gut-on-a-chip[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(1):E7–E15.
- [28] Jalili-Firoozinezhad S, Prantil-Baun R, Jiang A, et al. Modeling radiation injury-induced cell death and countermeasure drug responses in a human gut-on-a-chip [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2):223.
- [29] Wang G, McCain ML, Yang L, et al. Modeling the mitochondrial cardiomyopathy of Barth syndrome with induced pluripotent stem cell and heart-on-chip technologies [J]. *Nat Med*, 2014, 20(6):616–623.
- [30] Montanez-Sauri SI, Sung KE, Berthier E, et al. Enabling screening in 3D microenvironments: probing matrix and stromal effects on the morphology and proliferation of T47D breast carcinoma cells [J]. *Integr Biol*, 2013, 5(3):631–640.
- [31] Lang JD, Berry SM, Powers GL, et al. Hormonally responsive breast cancer cells in a microfluidic co-culture model as a sensor of microenvironmental activity[J]. *Integr Biol*, 2013, 5(5):807–816.
- [32] Folkman J, Watson K, Ingber D, et al. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia [J]. *Nature*, 1989, 339(6219):58–61.
- [33] Nguyen DH, Stapleton SC, Yang MT, et al. Biomimetic model to reconstitute angiogenic sprouting morphogenesis in vitro[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(17):6712–6717.
- [34] Chen MB, Whisler JA, Jeon JS, et al. Mechanisms of tumor cell extravasation in an in vitro microvascular network platform[J]. *Integr Biol*, 2013, 5(10):1262–1271.
- [35] Moya ML, Hsu YH, Lee AP, et al. In vitro perfused human capillary networks [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2013, 19(9):730–737.
- [36] Bischel LL, Young EW, Mader BR, et al. Tubeless microfluidic angiogenesis assay with three-dimensional endothelial-lined microvessels [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(5):1471–1477.
- [37] Baker BM, Trappmann B, Stapleton SC, et al. Microfluidics embedded within extracellular matrix to define vascular architectures and pattern diffusive gradients[J]. *Lab Chip*, 2013, 13(16):3246–3252.
- [38] Wang X, Phan DT, Sobrino A, et al. Engineering anastomosis between living capillary networks and endothelial cell-lined microfluidic channels[J]. *Lab Chip*, 2016, 16(2):282–290.
- [39] Kim S, Lee H, Chung M, et al. Engineering of functional, perfusable 3D microvascular networks on a chip [J]. *Lab Chip*, 2013, 13(8):1489–1500.
- [40] Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, et al. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors [J]. *Nat Genet*, 2003, 33(1):49–54.
- [41] Li R, Hebert JD, Lee TA, et al. Macrophage-secreted TNF α and TGF β 1 influence migration speed and persistence of cancer cells in 3D tissue culture via independent pathways[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(2):279–290.
- [42] Erdogan B, Ao M, White LM, et al. Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin[J]. *Cell Biol*, 2017, 216(11):3799–3816.
- [43] Chen YA, King AD, Shih HC, et al. Generation of oxygen gradients in microfluidic devices for cell culture using spatially confined chemical reactions [J]. *Lab Chip*, 2011, 11(1):3626–3633.
- [44] Xu Z, Gao Y, Hao Y, et al. Application of a microfluidic chip-based 3d co-culture to test drug sensitivity for individualized treatment of lung cancer [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(16):4109–4117.
- [45] Pavesi A, Adriani G, Tay A, et al. Engineering a 3D microfluidic culture platform for tumor-treating field application[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:26584.