

· 药剂与炮制 ·

# 微流控肠-肝-乳腺癌芯片的构建及其体外药物 PK-PD 分析

黄恒顺<sup>1</sup>, 邓九<sup>1</sup>, 李晓瑞<sup>1</sup>, 陈宗正<sup>2\*</sup>, 罗勇<sup>1\*</sup>

(1. 大连理工大学 化工学院, 辽宁 大连 116023; 2. 深圳大学 第一附属医院, 广东 深圳 518035)

**[摘要]** 目的: 基于微流控技术构建肠-肝-乳腺癌多器官芯片并将其用于药物的体外药物代谢动力学-药物效应动力学(PK-PD)研究。方法: 利用微流控技术构建包含 4 层聚二甲基硅氧烷(PDMS)基板和 2 层聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)盖板的多器官芯片;分别使用 CellTracker Red/Green 和 Hoechst 对生长 21 d 的人结肠癌细胞株 Caco-2 细胞层和生长 3 d 的人脐静脉内皮细胞株 HUVEC 细胞层进行染色,考察细胞间的连接情况,通过测定  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  荧光素钠和  $33.28\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  普萘洛尔跨细胞层的透过率来验证所建肠模块的功能;通过比较  $125\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  环磷酰胺经过常规孔板中人肝癌细胞株 HepG2 细胞和芯片肝模块处理 48 h 后对人乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞的抑制率来考察肝模块的代谢水平;通过检测芯片中 HepG2 细胞分泌白蛋白情况验证肝模块的合成功能;将 Caco-2 细胞层, HUVEC 细胞层, HepG2 细胞层, MCF-7 细胞层及透析膜组装在芯片上,在芯片上层通道中通入含  $55\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  普萘洛尔的培养液 4 h 后换成正常培养液,检测 72 h 内各个时间点下层循环培养液中普萘洛尔的质量浓度,绘制药-时曲线;在芯片上层循环液中分别通入含  $125\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  环磷酰胺,  $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  紫杉醇,  $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  卡培他滨的培养液,研究 3 种抗肿瘤药物在芯片上对 MCF-7 细胞层的 72 h 抑制率,并将该结果与 96 孔板结果进行比较。结果: 构建的芯片运行良好, Caco-2 和 HUVEC 细胞层均连接紧密, 荧光素钠和普萘洛尔在细胞层间的透过率证明构建的肠模块具有良好的吸收转运功能;  $125\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  环磷酰胺经孔板上的 HepG2 细胞代谢后对 MCF-7 的抑制率 22.12%, 未被代谢的环磷酰胺对 MCF-7 的抑制率 1.84%; 而  $125\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  环磷酰胺从芯片肝模块上层注入后对 MCF-7 的抑制率提升至 32.13%, 而从芯片肝模块下层注入后对 MCF-7 的抑制率 7.23%; 测得普萘洛尔质量浓度在芯片上随时间变化的趋势与体内基本一致;  $125\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  环磷酰胺在孔板上对 MCF-7 的抑制率比芯片上要低, 而  $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  紫杉醇和  $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  卡培他滨在孔板上对 MCF-7 的抑制率则高于芯片结果。结论: 构建的肠-肝-乳腺癌多器官芯片具有肠的吸收转运功能、肝的代谢功能; 该芯片能够反映普萘洛尔在体内的药代动力学特性, 同时可用于紫杉醇和卡培他滨的药效学研究。

**[关键词]** 微流控技术; 器官芯片; 抗肿瘤活性; 肠吸收; 肝代谢; 细胞培养; 药物代谢动力学-药物效应动力学

**[中图分类号]** R22; R28; C37; R94; Q2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)02-0104-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20191749

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190515.1436.001.html>

**[网络出版时间]** 2019-05-17 11:22

## Construction of A Microfluidic Intestine-liver-breast Cancer Chip and Analysis of Its Application in PK-PD *In Vitro* of Drugs

HUANG Heng-shun<sup>1</sup>, DENG Jiu<sup>1</sup>, LI Xiao-rui<sup>1</sup>, CHEN Zong-zheng<sup>2\*</sup>, LUO Yong<sup>1\*</sup>

(1. School of Chemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116023, China;

2. The First Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518035, China)

**[Abstract]** **Objective:** A multi-organ chip of intestine-liver-breast cancer was constructed based on microfluidic technology and used for pharmacokinetics-pharmacodynamics (PK-PD) study of drugs *in vitro*.

**[收稿日期]** 20190325(022)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(21675017)

**[第一作者]** 黄恒顺, 硕士, 从事微流控器官芯片研究, E-mail: 1075812955@qq.com

**[通信作者]** \* 罗勇, 博士, 副教授, 从事微流控器官芯片研究, E-mail: yluo@dlut.edu.cn;

\* 陈宗正, 博士, 助理研究员, 从事微流控器官芯片研究, E-mail: chenmond@foxmail.com

**Method:** A multi-organ chip comprising a 4-layer polydimethylsiloxane (PDMS) substrate and a 2-layer poly (methyl methacrylate) (PMMA) cover was constructed by microfluidic technology. The connection between cells was investigated by staining the 21-day-grown human colon cancer cell line Caco-2 cell layer and the 3-day-grown human umbilical vein endothelial cell line HUVEC cell layer with CellTracker Red/Green and Hoechst, respectively. The transmission rates of  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  fluorescein sodium and  $33.28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  propranolol acrossing the cell layer were employed to verify the function of the constructed intestinal module. The metabolic level of the liver module was investigated by comparing the inhibition rate of  $125 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  cyclophosphamide against human breast cancer cell line MCF-7 cells treated with human hepatoma cell line HepG2 cells in a conventional well plate and chip liver module for 48 h. The secretion of albumin by HepG2 cells in the chip was detected to verify the synthesis function of hepatic module. Caco-2 cell layer, HUVEC cell layer, HepG2 cell layer, MCF-7 cell layer and dialysis membrane were assembled on the chip, the culture medium containing  $55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  propranolol was injected into the upper channel of the chip for 4 h, and then changed into the normal culture solution. The mass concentration of propranolol in the lower circulating culture medium at each time point within 72 h was determined, and the drug-time curve was drawn. The culture medium containing  $125 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  cyclophosphamide,  $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  paclitaxel,  $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  capecitabine was injected into the circulating fluid in the upper layer of the chip, in order to study the inhibition rates of the three anti-tumor drugs on the MCF-7 cell layer on the chip within 72 h, and the results were compared with those of the 96-well plate. **Result:** The constructed chip performed well. The Caco-2 and HUVEC cell layers were tightly connected. The transmission of fluorescein sodium and propranolol between the cell layers demonstrated that the constructed intestinal module had good absorption and transport function. The inhibition rate of MCF-7 by  $125 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  cyclophosphamide after metabolism of HepG2 cells on the well plate was 22.12%, and the inhibition rate of MCF-7 by the unmetabolized cyclophosphamide was 1.84%. The inhibition rate of MCF-7 increased to 32.13% after injected  $125 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  cyclophosphamide from the upper layer of the chip liver module, and the inhibition rate of MCF-7 after injection from the lower layer of the chip liver module was 7.23%. The mass concentration of propranolol on the chip changed with time, which was basically consistent with that *in vivo*. The inhibition rate of MCF-7 on the plate with  $125 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  cyclophosphamide was lower than that on the chip, and the inhibition rates of MCF-7 on the plate with  $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  paclitaxel and  $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  capecitabine were higher than those on the chip. **Conclusion:** The constructed multi-organ chip of intestine-liver-breast cancer has the absorption and transport function of the intestine and the metabolic function of the liver. The chip can reflect the pharmacokinetic properties of propranolol *in vivo*, and can be used for pharmacodynamic studies of paclitaxel and capecitabine.

[**Key words**] microfluidics; organ chip; antitumor activity; intestinal absorption; liver metabolism; cell culture; pharmacokinetics-pharmacodynamics

新药的研究与开发是一个成本巨大、时间冗长且成功率极低的过程,大量的目标化合物在经过临床前的细胞实验和动物实验之后被淘汰,而进入临床 I 期试验的化合物仍有 90% 被淘汰<sup>[1]</sup>。传统的二维细胞实验难以构建细胞及体内组织的真实微环境,也不能实现器官之间的真实串扰<sup>[2]</sup>。动物实验则耗时长、成本高、存在伦理争议,且由于种属差异导致测试结果难以应用到人类身上<sup>[3]</sup>。因此,需要开发出更接近人体真实体内情况且成本较低的体外模型以应用于临床前药物筛选。

药物临床前的药物代谢动力学-药物效应动力

学(PK-PD)研究对于阐明药物进入人体后的吸收、分布、代谢和排泄及其经时过程等机体对药物的作用,揭示药物效应随时间和浓度变化的动力学过程具有重大意义。目前,用于药物临床前 PK-PD 研究的模型主要为动物模型,例如大鼠、小鼠、兔子等,然而,动物模型由于存在种属差异经常导致错筛或漏筛等结果,造成了极大的人力和财力损失。微流控芯片技术在微尺度下对流体进行精准操控,实现对生物、化学等样品的微尺度试验,可实现高度集成化、小体积、高通量等目标<sup>[4-5]</sup>。器官芯片(organ-on-a-chip)是基于微流控技术制造模拟人体器官主要

生理特征或功能的系统,该系统可通过微通道及泵阀之间的连接实现细胞或组织之间的串扰连接,可在体外较为真实地反映人体的部分功能<sup>[6]</sup>。目前,器官芯片研究主要集中在构建单个器官芯片,已有研究人员成功构建了肠芯片<sup>[7]</sup>、肝芯片<sup>[8-11]</sup>、肾芯片<sup>[12-14]</sup>、心脏芯片<sup>[15-17]</sup>、肺芯片<sup>[18-19]</sup>等器官芯片,这些器官芯片以在体外实现某个器官的功能为主。将多个不同器官或组织组装在一起的多器官芯片近年来逐渐成为研究热点,Maschmeyer 等<sup>[20]</sup>构建一个整合了肠、肝脏、皮肤和肾的四器官共培养系统,可以实现 4 个器官的细胞在该系统上共培养达 28 d。AN 等<sup>[21]</sup>利用搭建的多器官芯片平台评估药物的抗肿瘤活性、肝毒性及药物代谢动力学,同时开展了多种药物在该芯片上的吸收、分布、代谢、排泄(ADME)过程试验。Sung 等<sup>[2]</sup>利用水凝胶将肝、肿瘤、骨髓的细胞三维共培养于芯片中,在芯片上研究 5-氟尿嘧啶的 PK-PD 过程,所得结果与理论模型计算结果相符合。然而,在目前多器官芯片的构建过程中,器官与器官之间相互独立,各个器官都单独施加一个循环体系。事实上,人体中各器官之间是通过公共血液循环系统相互连接并相互影响的。

本实验拟通过微流控芯片技术构建一个具有公共循环培养通道(模拟公共血液循环),共同培养 4 种细胞的多器官仿生芯片,这 4 种细胞分别为 Caco-2, HUVEC, HepG2, MCF-7。其中, Caco-2 细胞单层可模拟小肠上皮细胞用于构建芯片的吸收功能<sup>[7,22]</sup>, HUVEC 细胞单层可在体外模拟血管内皮屏障作用<sup>[21]</sup>, HepG2 细胞可用于构建体外代谢研究模型<sup>[23]</sup>, MCF-7 细胞是常用的体外乳腺癌模型构建工具<sup>[21,24]</sup>。通过构建并验证芯片中肠模块、肝模块的功能来实现芯片的吸收、代谢功能,并从检测普萘洛尔的药物浓度-时间曲线和抗肿瘤药物环磷酰胺、紫杉醇、卡培他滨的抗肿瘤活性 2 个方面研究药物在芯片中的 PK-PD 过程,该模型有望用于临床前药物筛选,为药物临床前 PK-PD 研究提供实验根据。

## 1 材料

HERAcell 150 型细胞培养箱和 Micro17 型高速离心机(美国 Thermo 公司), Synergy H1 型多功能酶标仪(美国 BioTek 公司), Mili-Q Academic 型超纯水仪(美国 Millipore 公司), BV-30/70 型垂直层流超净工作台(西班牙 Telstar 公司), IX71 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司), AUV 120D 型电子分析天平(日本 Shimadzu 公司), 205S 型蠕动泵(英国 Watson-Marlow 公司), LSP 10-1B 型注射泵(保定兰

格恒流泵有限公司), URE-2000/35 型紫外深度光刻机(中国科学院光电技术研究院), SC-1B 型匀胶机(北京金盛微纳科技有限公司), DGG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司)。

DMEM 高糖培养基, DMEM/F12 培养基, DMEM/F12 培养基(无酚红), 青霉素-链霉素混合溶液(100 × 双抗)(美国 Hyclone 公司, 批号分别为 AE24921270, AE24921272, AC10237765, SV30010); 胎牛血清(FBS)和鼠尾 I 型胶原(美国 Gibco 公司, 批号分别为 1942017, 2084715), 环磷酰胺、紫杉醇、普萘洛尔、荧光素钠对照品(美国 Sigma 公司, 批号分别为 WXBC7023, T7191, BCBJ2807, 061M0048V, 纯度依次为 97% ~ 103%, ≥ 97%, ≥ 99%, ≥ 99%), 卡培他滨对照品(美国 Aladdin 公司, 批号 K1406006, 纯度 ≥ 99%), 聚二甲基硅氧烷(PDMS, 美国 Dow Corning 公司, 批号 0008192937), SU-8 3035 胶(美国 MicroChem 公司, 批号 17080653), 白蛋白测试盒(南京建成生物工程研究所, 批号 20181219), 钙黄绿素(Calcein)-乙酰甲氧基甲酯(AM)/碘化丙啶(PI)活细胞/死细胞双染试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司, 批号 20190404), CellTracker Red/Green(美国 Invitrogen 公司, 批号 C7025), 1 μm 聚碳酸酯多孔膜(英国 Whatman 公司), Hoechst 33342 染色液(北京酷来搏科技有限公司, 批号 SK2040), 乳酸乙酯(天津市大茂化学试剂厂, 批号 20180518), 甲醇(色谱纯, 瑞典 Oceanpak 公司)。

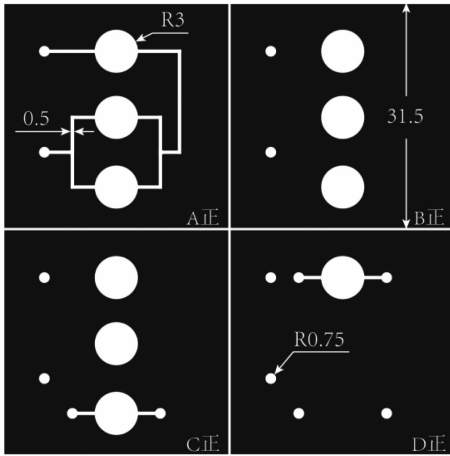
人脐静脉内皮细胞株 HUVEC, 人结肠癌细胞株 Caco-2, 人肝癌细胞株 HepG2, 人乳腺癌细胞株 MCF-7 均为本课题组所在实验室保存所有。

## 2 方法与结果

### 2.1 芯片设计及制造

利用 Adobe Illustrator CS6 绘制芯片掩膜的设计图, 见图 1。

将洗净的 75 mm × 75 mm 玻璃片置于匀胶机上, 以 1 000 r·min<sup>-1</sup> (30 s) 的速度旋涂 SU-8 3035 胶于玻璃片上, 在烘胶热板上烘干放凉, 在其上覆盖 63 mm × 63 mm 的掩膜, 置于紫外曝光机下曝光 15 s, 用乳酸乙酯进行显影后通道显现。然后制作围栏, 倒入配制好的 PDMS 6 g, 在真空烘箱中抽真空至 PDMS 中无气泡, 取出放至 80 °C 烘箱中 30 min 使得 PDMS 固化, 分离 SU-8 3035 模板和固化的 PDMS, 有通道的部分打孔, 按照叠加顺序将 PDMS 基板置于等离子体机中照射 3 min, 进行 PDMS 间的不可逆封接。待聚碳酸酯多孔膜上细胞层培养成熟



图中数字标注单位均为 mm

图 1 芯片掩膜的设计

Fig.1 Design of chip mask

后,按图 2 所示芯片结构组装芯片,用螺丝将芯片固定,用特氟龙管连接芯片与蠕动泵,设置蠕动泵流速为  $2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ,开启蠕动泵进行流动循环培养。

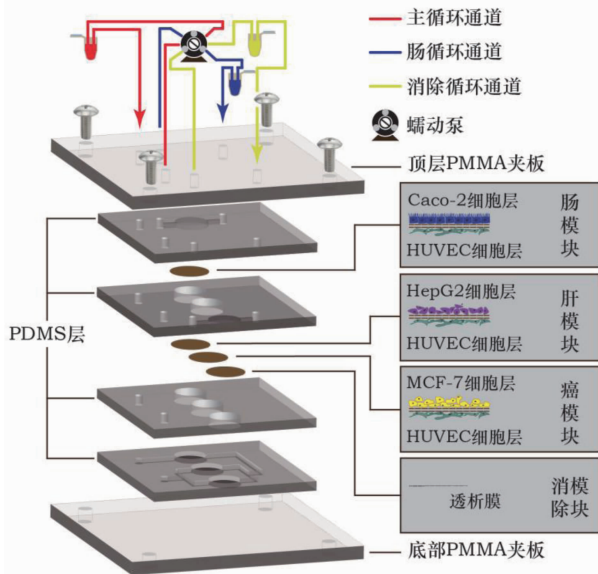


图 2 芯片的结构示意

Fig.2 Schematic diagram of chip structure

本研究设计了一种肠-肝-乳腺癌 PDMS 芯片,该芯片共 2 层,并有 3 条独立运行的通道,上层为肠模块,由朝上的 Caco-2 细胞层和背靠朝下的 HUVEC 细胞层组合而成,上方通循环液,为肠循环通道;下层有 3 个腔室,分别为朝上的 HepG2 细胞层与背靠朝下的 HUVEC 细胞层构成的肝模块、朝上的 MCF-7 细胞层与背靠朝下的 HUVEC 细胞层构成的乳腺癌模块、透析膜模拟的消除模块,在 3 个下层模块的下方通公共循环培养液,该循环培养液可

为肝模块、乳腺癌模块和消除模块同时提供营养物质,类似于体内的公共血液循环系统,透析膜上方设计有消除通道。

**2.2 细胞与细胞层培养** HUVEC 细胞和 MCF-7 细胞均用 DMEM/F12 + 10% FBS + 1% 青霉素-链霉素混合溶液 ( $100 \times$  双抗) 培养液 (简称 F12 培养液) 培养, Caco-2 细胞和 HepG2 细胞均用 DMEM 高糖培养基 + 10% FBS + 1% 青霉素-链霉素混合溶液 ( $100 \times$  双抗) (简称 DMEM 培养液) 培养,于  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$  饱和湿度的恒温培养箱内进行传代培养。将孔径为  $1 \mu\text{m}$  的透明聚碳酸酯多孔膜用直径 8 mm 的打孔笔裁剪成直径 8 mm 的圆片,浸于 75% 乙醇中 24 h,取出置于 35 mm 培养皿中,随后用超纯水冲洗 3 次后紧密排布于 35 mm 培养皿中,随后用  $5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  的鼠尾 I 型胶原包被皿中晾干的多孔膜,分别将消化成细胞悬液的 Caco-2 细胞, HepG2 细胞, HUVEC 细胞和 MCF-7 细胞接种于 4 个包被有多孔膜的皿中,各细胞的接种密度分别为  $8 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^4$  个/ $\text{cm}^2$ ,成熟时间分别为 17 ~ 22, 1, 3, 1 d。

**2.3 肠模块的构建及其功能验证** 分别使用 CellTracker Red/Green 和 Hoechst 33342 染色液对生长 21 d 的 Caco-2 细胞层和生长 3 d 的 HUVEC 细胞层进行染色,考察细胞间的连接情况。图 3 为 Caco-2 在多孔膜上生长 21 d 和 HUVEC 在多孔膜上生长 3 d 后的染色照片,结果发现这 2 种细胞在多孔膜表面完全铺满、连接紧密。

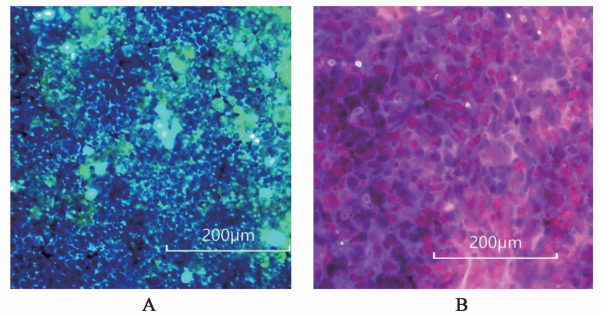


图 3 Caco-2 细胞层 (A) 和 HUVEC 细胞层 (B) (免疫荧光,  $\times 200$ )  
Fig.3 Fluorescence staining of Caco-2 cell layer (A) and HUVEC cell layer (B) (IF,  $\times 200$ )

配制质量浓度分别为 0.5, 0.05, 0.025, 0.005, 0.0025, 0.0005  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的荧光素钠对照品溶液,在酶标仪中测定荧光强度 (激发波长 488 nm, 发射波长 530 nm, 下同),以质量浓度为横坐标,荧光强度为纵坐标,绘制标准曲线,得拟合直线方程  $Y =$

146 582X + 3 566. 6 ( $R^2 = 0.998 8$ )。在芯片第一、二层 PDMS 间夹入培养 21 d 的 Caco-2 细胞多孔膜,在细胞层上层通道中分别通入含  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  荧光素钠和  $33.28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  普萘洛尔的无酚红 DMEM/F12 空培养基,下层通无酚红 DMEM/F12 空培养基,启动注射泵单向灌注培养,每隔 30 min 取下层培养基  $50 \mu\text{L}$ ,共取 5 次。将 Caco-2 细胞多孔膜分别换成空多孔膜和培养 3 d 的 HUVEC 细胞多孔膜,重复同样的实验。在酶标仪中检测荧光强度,计算样品溶液中荧光素钠的质量浓度。配制质量浓度分别为 66.56, 33.28, 16.64, 8.32, 4.16, 2.08, 1.04,  $0.52 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的普萘洛尔对照品溶液,采用 HPLC 测定普萘洛尔的质量浓度,色谱条件为流动相  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾-水-甲醇 (2 : 43 : 55), ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),

检测波长 210 nm。以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得拟合直线方程  $Y = 72.733X - 7.735 4$  ( $R^2 = 0.997 9$ ),根据该方程计算样品溶液中普萘洛尔的质量浓度。

根据公式  $P_{\text{app}} = \Delta Q / (\Delta t \times A \times C_0)$  计算荧光素钠的透过率,其中  $\Delta Q$  为相邻 2 次下层培养液样品中待测物的量差值,用公式  $C_2 V_2 - C_1 V_1$  计算,单位为 mg,  $C_1, C_2$  和  $V_1, V_2$  分别为相邻 2 次下层培养液样品溶液的质量浓度和体积; $\Delta t$  为 1 800 s;  $A$  为传质面积  $0.282 7 \text{ cm}^2$ ;  $C_0$  为上层培养液中初始荧光素钠质量浓度  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。普萘洛尔透过率计算方法同荧光素钠,其中  $C_0 = 33.28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见表 1。结果发现荧光素钠在 Caco-2 细胞层的透过率低于普萘洛尔在 Caco-2 细胞层的透过率 2 个数量级,荧光素钠和普萘洛尔在 HUVEC 细胞层的透过率相差不大。

表 1 Caco-2 细胞层和 HUVEC 细胞层中荧光素钠、普萘洛尔的透过率 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Transmission rates of fluorescein sodium and propranolol in Caco-2 cell layer and HUVEC cell layer ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) cm · s<sup>-1</sup>

药物	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Caco-2 细胞层	HUVEC 细胞层
荧光素钠	2 000	$4.614 \times 10^{-7} \pm 2.823 \times 10^{-7}$	$4.558 \times 10^{-6} \pm 3.529 \times 10^{-6}$
普萘洛尔	33.28	$1.225 \times 10^{-5} \pm 0.238 \times 10^{-5}$	$7.698 \times 10^{-6} \pm 1.009 \times 10^{-6}$

**2.4 肝模块的构建及其代谢水平考察** 取一块 96 孔板 (记为孔板 1),每孔接种 6 000 个 HepG2 细胞,用 DMEM 培养液培养。24 h 后移走 DMEM 培养液,在 6 个孔中分别加入含  $125 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  环磷酰胺的 DMEM 培养液  $200 \mu\text{L}$ ,作为组一;在另外 6 个孔中分别加入 DMEM 培养液  $200 \mu\text{L}$ ,作为组二。同时另取一块 96 孔板 (记为孔板 2),在 24 个孔中分别接种 6 000 个 MCF-7 细胞,用 F12 培养液培养。将上述 2 块孔板置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  恒温培养箱中培养 12 h。然后将孔板 2 的 F12 培养液全部移出,将孔板 2 的 24 个孔平均分成 4 组,分别记为实验组 1 ~ 3 和空白组,分别加入孔板 1 中组一的培养液、孔板 1 中组二的培养液、含  $125 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  环磷酰胺的 DMEM 培养液以及 DMEM 培养液  $200 \mu\text{L}$ ,将孔板 2 置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  恒温培养箱中孵育 48 h 后移出培养液,加入含  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  噻唑蓝 (MTT) 的磷酸盐缓冲液 (PBS,  $\text{pH} = 7.2$ )  $200 \mu\text{L}$  孵育 4 h,弃去 PBS,晾干后加入二甲基亚砜 (DMSO)  $150 \mu\text{L}$ ,震荡 15 min,于 490 nm 处测定吸光度  $A$ ,按公式抑制率 =  $(A_{\text{空白组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{空白组}}$  计算药物对 MCF-7 细胞的增殖抑制率,结果实验组 1 ~ 3 的 MCF-7 细胞增殖抑制率分别为  $(22.12 \pm 8.74)\%$ ,  $(3.06 \pm 5.46)\%$ ,  $(1.84 \pm$

$4.68)\%$ ,说明环磷酰胺在孔板上经 HepG2 细胞处理后抗肿瘤活性有很大提高。

在芯片第二、三层 PDMS 间的肝模块和乳腺癌模块腔室处分别背对夹入 HepG2, HUVEC 细胞层和 MCF-7, HUVEC 细胞层,上层肠循环通道和下层主循环通道分别通入 DMEM 培养液流动培养 12 h,然后将上层循环液换成含  $125 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  环磷酰胺的 DMEM 培养液作为实验组 1,下层循环液换成含  $125 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  环磷酰胺的 DMEM 培养液作为实验组 2,实验组 3 为上、下层均为 DMEM 培养液。芯片循环流动培养 48 h 后,拆开芯片取下 MCF-7 细胞层置于 48 孔板中,加入含  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT 的 PBS  $200 \mu\text{L}$  孵育 4 h,弃去 PBS,晾干后加入 DMSO  $200 \mu\text{L}$ ,震荡 15 min 后取出样品溶液  $150 \mu\text{L}$  加入 96 孔板中,于 490 nm 处测定  $A$ ,计算实验组 1 ~ 3 的 MCF-7 细胞增殖抑制率分别为  $(32.13 \pm 2.51)\%$ ,  $(7.23 \pm 0.96)\%$ ,  $(4.72 \pm 0.83)\%$ 。说明含  $125 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  环磷酰胺的培养液从芯片上层肠循环通道注入芯片循环培养 48 h 后对 MCF-7 的增殖抑制率高于孔板实验组 1 的抑制率,而从下层主循环通道注入芯片循环培养 48 h 后对 MCF-7 的增殖抑制率比孔板实验组 3 中未被 HepG2 细胞代谢的

环磷酸胺所引起的抑制率要高。

同时,在芯片空白组中每隔 24 h 采集 HepG2 细胞层上侧循环液 10  $\mu\text{L}$ ,用白蛋白试剂盒检测所采集循环液中白蛋白的质量浓度。结果发现循环培养 1,2,3 d 时白蛋白分泌量依次为  $(4.659 \pm 0.508)$ ,  $(4.055 \pm 0.572)$ ,  $(4.366 \pm 0.904) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,说明循环培养 3 d 内白蛋白的分泌量基本稳定。

**2.5 药物质量浓度随时间变化趋势的检测** 在芯片肠循环通道通入含  $55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  普萘洛尔的 DMEM 培养液,开启蠕动泵循环培养 4 h 后更换成正常的 DMEM 培养液,在每个采样时间点时取出下层循环液 20  $\mu\text{L}$  置于离心管中,在采集的样品溶液中分别加入甲醇 20  $\mu\text{L}$  吹匀,于  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min,移取上清液置于高效液相色谱仪中检测,计算样品溶液中普萘洛尔的质量浓度,以时间为横坐标轴,普萘洛尔质量浓度为纵坐标轴,绘制药物流浓度-时间曲线,见图 4。结果发现在初始阶段,普萘洛尔在培养液中质量浓度随时间的增加而快速上升,于 6 h 左右达最大值,之后就随着时间增加而缓慢下降。

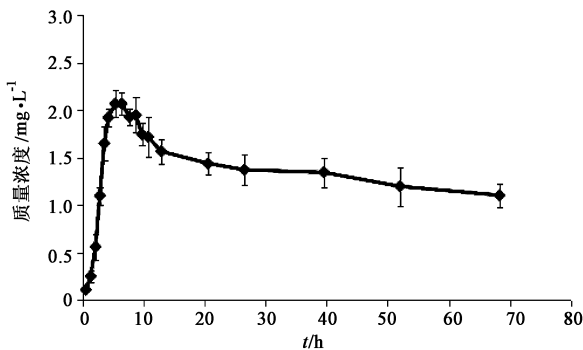


图 4 普萘洛尔质量浓度在芯片上随时间变化的曲线 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Fig. 4 Curve of propranolol concentration over time on a chip ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**2.6 抗肿瘤药物的活性检测** 在芯片肠循环通道中分别通入含  $125 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  环磷酸胺,  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  紫杉醇,  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  卡培他滨的 DMEM 培养液,开启蠕动循环培养 72 h,拆开芯片取下 MCF-7 细胞层置于 48 孔板中,加入含  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT 的 PBS 200  $\mu\text{L}$  孵育 4 h,弃去 PBS,晾干后加入 DMSO 200  $\mu\text{L}$ ,震荡 15 min 后取出样品溶液 150  $\mu\text{L}$  加入 96 孔板中,于 490 nm 处测定 A。

取 1 块 96 孔板(记为孔板 1),每孔接种 6 000 个 HepG2 细胞,用 DMEM 培养液培养,24 h 后移出所有 DMEM 培养液,分别加入含  $125 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  环磷酸胺,  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  紫杉醇,  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  卡培他滨的

DMEM 培养液 200  $\mu\text{L}$ ;另取 1 块 96 孔板(记为孔板 2),在 12 个孔中分别接种 6 000 个 MCF-7 细胞,用 F12 培养液培养。上述 2 块孔板均置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱培养 24 h,将孔板 2 中的 F12 培养液全部移出,将孔板 2 的 12 个孔平均分成 4 组,分别记为环磷酸胺组、紫杉醇组、卡培他滨组、空白组,每组 3 个孔,分别加入孔板 1 含  $125 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  环磷酸胺的 DMEM 培养液,含  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  紫杉醇的 DMEM 培养液,含  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  卡培他滨的 DMEM 培养液以及 DMEM 培养液 200  $\mu\text{L}$ 。将孔板 2 置于培养箱中孵育 48 h 后移出培养液,加含  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT 的 PBS 200  $\mu\text{L}$  孵育 4 h,弃去 PBS,晾干后加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ ,震荡 15 min,在酶标仪中检测样品溶液在 490 nm 处的 A。

芯片试验与孔板试验中环磷酸胺、紫杉醇、卡培他滨对 MCF-7 细胞的 72 h 抑制率见表 2。结果发现环磷酸胺在芯片上对 MCF-7 细胞的抑制效果要高于孔板。卡培他滨在孔板上经 HepG2 处理后对 MCF-7 细胞的抑制率接近 50%,但在芯片上对 MCF-7 细胞的抑制率则有所降低。紫杉醇在孔板上经 HepG2 处理后对 MCF-7 细胞的抑制率要高于其在芯片上的抑制率。

表 2 环磷酸胺、卡培他滨、紫杉醇对 MCF-7 细胞的 72 h 抑制率 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

药物	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	孔板试验	芯片试验	%
环磷酸胺	125	23.89 $\pm$ 2.43	34.39 $\pm$ 5.13	
卡培他滨	50	48.92 $\pm$ 3.21	36.59 $\pm$ 4.01	
紫杉醇	5	78.01 $\pm$ 2.32	56.17 $\pm$ 6.96	

**2.7 统计学分析** 所有数据均用 Microsoft Excel 2010 软件进行分析与整理,组内采用单因素方差分析,组间比较采用 t 检验,各组数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 讨论

口服药物入胃后经幽门进入小肠,在小肠绒毛处被吸收,经肠系膜静脉进入血液,经门静脉到达肝脏,在肝脏中被肝细胞的肝微粒体酶代谢后进入肝静脉,然后随血液汇入下腔静脉,经下腔静脉进入右心房,经左心房的主动脉泵出,然后跟随体内丰富的血管分布到达全身各处(包括靶器官),经过一段时间之后,药物逐渐经肾动脉进入肾脏,最后经肾脏消除作用排出体外。基于上述过程,本研究设计并构

建了一种包含肠模块、肝模块、乳腺癌模块及透析膜消除模块的多器官芯片,在该芯片中同时设计有肠腔循环通道、公共循环通道及物质消除通道,芯片各模块通过微流体实现连接,通过蠕动泵实现系统的封闭循环,培养液灌注流速为  $2 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ,实验中可利用各种检测手段实时监测芯片中目标生物标记物或目标药物的变化情况。

为确保构建的芯片具备吸收和代谢的功能,需对构建的肠模块与肝模块进行功能验证。药物在体内经小肠处的小肠绒毛吸收,小肠绒毛处由肠上皮细胞和毛细血管内皮细胞构成,故本研究选择 Caco-2 细胞层和 HUVEC 细胞层在体外分别模拟肠上皮细胞和血管内皮细胞<sup>[25]</sup>,以模拟小肠吸收情况。实验中通过检测荧光素钠和普萘洛尔在细胞层间的透过率来考察这 2 个细胞层的物质运输能力,结果发现同为小分子的荧光素钠和普萘洛尔在 HUVEC 细胞层中透过率相差较小,这符合小分子物质在血管内皮间自由扩散的特性,可用于构建血管内皮屏障;而 Caco-2 细胞层中的荧光素钠透过率很低,且低于普萘洛尔透过率 2 个数量级,表明荧光素钠不易被 Caco-2 细胞层吸收,普萘洛尔则因被动转运而被良好转运<sup>[26]</sup>,说明构建的 Caco-2 细胞层具有良好的选择透过性,可用于构建体外肠吸收模型,同时也说明芯片封接的紧密性良好。体内药物代谢的主要部位是肝脏,药物在肝细胞中被代谢。本研究利用 HepG2 细胞构建了肝代谢模块,利用前药环磷酰胺考察 HepG2 细胞的代谢水平,环磷酰胺在铺满 HepG2 细胞的孔板中被代谢 12 h 后对 MCF-7 细胞的 48 h 增殖抑制率要低于在芯片中的结果,说明其在芯片上能提高 HepG2 细胞的代谢水平,这可能与芯片结构中的流动培养及细胞间的相互作用有关,而且其他细胞分泌的因子有可能会促进 HepG2 细胞的代谢。而环磷酰胺注入芯片下层主循环通道循环培养 48 h 后对 MCF-7 细胞的增殖抑制率高于孔板中没有被代谢的环磷酰胺所引起的增殖抑制率,这可能是因为主循环通道培养液中的环磷酰胺渗透到 HepG2 细胞层后被代谢,然后再转到下层培养液所致,这也证明该芯片中各通道间可实现物质交换。在芯片运行的 3 d 内白蛋白的分泌量保持稳定,表明芯片结构能够保持 HepG2 细胞的活力。综上所述,本研究中构建的多器官芯片具备良好的肠吸收和肝代谢功能。

通过考察药物在构建的肠-肝-乳腺癌芯片上的 PK-PD 特性来研究芯片的生理功能。口服药物进

入体内被吸收代谢后进入下腔静脉然后到达心脏,经心脏动脉泵出后分布到全身各处,从而引起药物效应,最后被肾脏消除排出体外,这个过程使得口服药物的血药浓度随着时间变化的曲线呈“几”字形。本研究利用含有吸收、透血管、代谢及消除功能的芯片检测并绘制的普萘洛尔药-时曲线大致走向与已有研究的普萘洛尔体内药-时曲线相似<sup>[27]</sup>,但达峰时间延长至 6 h 左右,且到达峰值后消除速度变得很慢,这可能是由于透析膜的透过消除作用与肾脏的消除作用差异较大造成的。普萘洛尔药-时曲线结果表明构建的多器官芯片具备良好的 PK 特性。抗肿瘤活性测试结果在孔板和芯片上均有较为明显的差距,其中在芯片上环磷酰胺对 MCF-7 的 72 h 抑制率较孔板结果有所增强,即抗肿瘤活性有所提高,卡培他滨和紫杉醇在芯片上对 MCF-7 的 72 h 抑制率较孔板结果均有所下降,这可能是因为 Caco-2 细胞层和 HUVEC 细胞层所形成的屏障减小了紫杉醇和卡培他滨透到下层的量,进而降低了其抗肿瘤活性。这也说明构建的多器官芯片具备良好的 PD 特性。

本研究根据口服药物进入人体的过程设计了包含肠吸收、肝代谢、透析膜透过消除及乳腺癌病灶的多器官微流控芯片,在体内过程中,血管屏障及血液是物质运输与交换的重要载体<sup>[28]</sup>,而心脏主导的公共血液循环系统使得体内各器官之间实现信息互通<sup>[29]</sup>,说明体外构建人体模型时包含血管屏障的公共循环系统是仿生模型的重要一环,然而现有的多器官芯片系统中尚无同时综合血管屏障和公共循环系统进行研究的报道。例如 AN 等<sup>[21]</sup>研发的用于 ADME 研究的多器官芯片中考虑了血管屏障的作用,但各器官之间需单独提供循环培养液,并没有考虑公共血液循环系统。Maschmeyer 等<sup>[20]</sup>所构建的四器官芯片中的替代血液回路能够同时为 4 种器官提供营养物质,但 4 个器官处在同一条回路上,且没有考虑血管屏障作用,这种结构与体内公共血液循环系统相去甚远。ZHANG 等<sup>[3]</sup>和 Kimura 等<sup>[30]</sup>研究的多器官芯片系统设计了公共循环通道,然而结构中都没有设计血管屏障。在本研究的芯片结构设计中,消除模块之外的各模块均有 HUVEC 细胞层与培养液直接连通,这能够起到血管屏障及物质运输的作用,而公共循环培养通道可同时为肝模块、乳腺癌模块和透析膜消除模块提供营养物质,芯片中同时包含血管屏障和公共循环系统是本研究有别于其他多器官芯片的设计,使得本芯片结构设计更仿

生。功能验证结果表明本研究构建的多器官芯片具备良好的吸收、代谢功能以及良好的 PK-PD 生理特性,这种基于微流控技术的多器官芯片可实现流体剪切力、细胞间相互作用等细胞微环境,可为临床前药物筛选提供理想的研究平台。然而,本研究中用于构建器官的人源细胞系虽然能表现出正常人体细胞的部分功能,但还是有较大差距,而且消除模块选用的透析膜与体内复杂的肾脏消除过程也尚有较大差距,同时芯片结构中构建的器官数量较少,而器官数量越多则各器官之间的串扰更能体现真实的体内情况。

综上所述,本研究根据口服药物进入人体的过程设计了包含肠吸收、肝代谢、透析膜透过消除及乳腺癌病灶的多器官微流控芯片,芯片在结构上设计了一个同时为肝模块、乳腺癌模块、消除模块提供营养物质的主循环通道,使得结构设计更加仿生。利用普萘洛尔和荧光素钠的跨细胞膜透过率来验证肠模块的功能,通过测定白蛋白分泌量及环磷酸代谢前后的药效来验证肝模块的功能,并利用芯片考察了普萘洛尔的药物浓度随时间变化的关系和抗肿瘤药物环磷酸、紫杉醇、卡培他滨的抗肿瘤活性,所得普萘洛尔药-时曲线与体内趋势相似,肠模块的存在使得芯片上紫杉醇和卡培他滨的抗肿瘤活性明显不同于孔板。在后续研究中可换成更接近人体正常细胞的原代细胞,并通过优化芯片结构设计加入更多的器官从而使得系统更仿生,进而为药物筛选提供更加可靠的体外模型。

[参考文献]

[ 1 ] Seruga B, Ocana A, Amir E, et al. Failures in phase III : causes and consequences [ J ]. Clin Cancer Res, 2015, 21 ( 20 ) : 4552-4560.

[ 2 ] Sung J H, Srinivasan B, Esch M B, et al. Using physiologically-based pharmacokinetic-guided " body-on-a-chip " systems to predict mammalian response to drug and chemical exposure [ J ]. Exp Biol Med ( Maywood ), 2014, 239 ( 9 ) : 1225-1239.

[ 3 ] ZHANG C, ZHAO Z Q, Abdul-Rahim N A, et al. Towards a human-on-chip: culturing multiple cell types on a chip with compartmentalized microenvironments [ J ]. Lab Chip, 2009, 9 ( 22 ) : 3185-3192.

[ 4 ] Volpatti L R, Yetisen A K. Commercialization of microfluidic devices [ J ]. Trends Biotechnol, 2014, 32 ( 7 ) : 347-350.

[ 5 ] 郭明星, 赵保胜, 高晓燕. 微流控技术在医药领域的

研究进展 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 ( 18 ) : 323-327.

[ 6 ] Bhatia S N, Ingber D E. Microfluidic organs-on-chips [ J ]. Nat Biotechnol, 2014, 32 ( 8 ) : 760-772.

[ 7 ] Kim H J, Huh D, Hamilton G, et al. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow [ J ]. Lab Chip, 2012, 12 ( 12 ) : 2165-2174.

[ 8 ] Nakao Y, Kimura H, Sakai Y, et al. Bile canaliculi formation by aligning rat primary hepatocytes in a microfluidic device [ J ]. Biomicrofluidics, 2011, 5 ( 2 ) : 22212.

[ 9 ] Lee P J, Hung P J, Lee L P. An artificial liver sinusoid with a microfluidic endothelial-like barrier for primary hepatocyte culture [ J ]. Biotechnol Bioeng, 2007, 97 ( 5 ) : 1340-1346.

[ 10 ] Kane B J, Zinner M J, Yarmush M L, et al. Liver-specific functional studies in a microfluidic array of primary mammalian hepatocytes [ J ]. Anal Chem, 2006, 78 ( 13 ) : 4291-4298.

[ 11 ] DENG J, ZHANG X L, CHEN Z Z, et al. A cell lines derived microfluidic liver model for investigation of hepatotoxicity induced by drug-drug interaction [ J ]. Biomicrofluidics, 2019, 13 ( 2 ) : 024101.

[ 12 ] QU Y Y, AN F, LUO Y, et al. A nephron model for study of drug-induced acute kidney injury and assessment of drug-induced nephrotoxicity [ J ]. Biomaterials, 2018, 155 : 41-53.

[ 13 ] Jang K, Mehr A P, Hamilton G A, et al. Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment [ J ]. Integr Biol, 2013, 5 ( 9 ) : 1119-1129.

[ 14 ] Weinberg E, Kaazempur-Mofrad M, Borenstein J. Concept and computational design for a bioartificial nephron-on-a-chip [ J ]. Int J Artif Organs, 2008, 31 ( 6 ) : 508-514.

[ 15 ] Agarwal A, Goss J A, Cho A, et al. Microfluidic heart on a chip for higher throughput pharmacological studies [ J ]. Lab Chip, 2013, 13 ( 18 ) : 3599-3608.

[ 16 ] Grosberg A, Alford P W, McCain M L, et al. Ensembles of engineered cardiac tissues for physiological and pharmacological study: heart on a chip [ J ]. Lab Chip, 2011, 11 ( 24 ) : 4165-4173.

[ 17 ] Mathur A, Loskill P, Shao K, et al. Human iPSC-based cardiac microphysiological system for drug screening applications [ J ]. Sci Rep, 2015, 5 ( 1 ) : 1-7.

[ 18 ] Huh D, Matthews, Benjamin D, et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip [ J ]. Science, 2010,



- 328(5986):1662-1668.
- [19] Huh D, Fujioka H, Tung Y C, et al. Acoustically detectable cellular-level lung injury induced by fluid mechanical stresses in microfluidic airway systems[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(48):18886-18891.
- [20] Maschmeyer I, Lorenz A K, 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.
- [21] AN F, QU Y Y, LUO Y, et al. A laminated microfluidic device for comprehensive preclinical testing in the drug ADME process[J]. Sci Rep, 2016, 6(1):1-8.
- [22] 陈江华, 杨林, 邓中平. 山豆根中主要成分在 Caco-2 细胞模型上的转运特性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(13):5-8.
- [23] LI Z, GUO Y, YU Y, et al. Assessment of metabolism-dependent drug efficacy and toxicity on a multilayer organs-on-a-chip[J]. Integr Biol(Camb), 2016, 8(10):1022-1029.
- [24] 覃庆洪, 黄敏, 谭启杏, 等. 白藜芦醇苷对人类乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响及其机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(4):143-148.
- [25] 党珏, 李燕, 刘美辰, 等. 大黄有效成分与附子有效成分在 Caco-2 细胞模型上的转运分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(7):1-6.
- [26] 蔡润兰, 王敏, 齐云, 等. Caco-2 细胞模型验证指标的选择与评判[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(24):1871-1875.
- [27] 余细勇, 林曙光, 杨敏, 等. 普萘洛尔及其代谢物 4-羟普萘洛尔的药代动力学[J]. 中国临床药理学杂志, 1991, 7(4):233-240.
- [28] 王雪, 修成奎, 杨静, 等. 人参-三七-川芎提取物对高糖高脂诱导血管内皮细胞衰老的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(1):124-129.
- [29] 王庭槐. 生理学[M]. 北京:高等教育出版社, 2004:99-113.
- [30] Kimura H, Ikeda T, Nakayama H, et al. An on-chip small intestine-liver model for pharmacokinetic studies[J]. J Lab Autom, 2015, 20(3):265-273.

[责任编辑 刘德文]