基于微流控技术构建3D肿瘤模型用于药物筛选

罗升昌^{1,2}, 王颖^{1,2}, 王士斌^{1,2}, 陈爱政^{1,2*}

1. 华侨大学生物材料与组织工程研究所, 厦门 361021;

2. 华侨大学化工学院, 福建省生物化工技术重点实验室, 厦门 361021

* 联系人, E-mail: azchen@hqu.edu.cn

2021-03-06 收稿, 2021-06-05 修回, 2021-06-24 接受, 2021-07-08 网络版发表

国家自然科学基金(32071323, 81971734, 31800794)和福建省科技创新团队发展计划资助

摘要 药物筛选是为了发现在疾病治疗层面上的生长抑制剂, 或者找到对某一特点表型细胞有杀伤作用的物质. 相比传统的药物筛选模型使用的二维细胞培养方法, 三维肿瘤模型可根据肿瘤细胞特性, 模拟实体组织状态下药物敏感和耐药模式, 从而提高标准抗癌药物筛选的精准性. 近年来, 三维培养系统用于药物筛选的研究受到广泛关注. 此外, 由于微流控技术在组织工程和药物筛选领域的应用不断发展, 特别是借助微流控技术构建体外三维肿瘤特征有独特优势. 本文结合三维肿瘤微环境研究, 阐述肿瘤微环境中的重要组成和功能, 重点对近年来基于微流控技术三维肿瘤模型培养方法在药物筛选领域的研究进展进行综述, 并对未来研究方向进行了展望.

关键词 微流控技术, 肿瘤微环境, 支架, 药物筛选

当前, 癌症药物研制和上市需要经过初始药物效果筛选、临床前研究、临床实验、监管审核以及市场反馈, 在此过程中会耗费大量时间和资本^[1]. 目前, 从癌症药物研发来看, 一种药物从实验室到上市的中间成本约为6.48亿美元^[2]. 其中, 药物开发临床筛选阶段会使用大量动物模型, 动物模型的使用不仅受到动物伦理限制^[3], 而且由于种间差异, 无法完全代表人类肿瘤组织特征^[4]. 传统二维(two dimension, 2D)培养模式是药物临床筛选阶段的另一个常用模式, 该模式有两个障碍: (1) 永生细胞系传代会引起基因型、表型差异以及出现细胞系与细胞系、支原体污染; (2) “动态互惠”的实体瘤微环境影响特定信号传递或者细胞形态^[1]. 为解决以上肿瘤药物开发带来的障碍, 越来越多研究者开始尝试体外构建药物筛选用途的三维(three dimension, 3D)肿瘤模型.

体外3D肿瘤模型构建在一定层面上是一种比动物

模型更能模拟人类组织特征的方法^[5], 在药物筛选过程中也可以作为动物实验到人体实验的桥梁, 以降低药物开发的失败率. 近年来, 随着新型生物材料的出现以及显微领域创造性方法的研究, 可应用于药物筛选的体外3D肿瘤模型有了更多发展条件^[6,7], 体外仿生制造不同类型肿瘤微环境(tumor microenvironments, TMEs)的3D肿瘤模型不断发展. 当前, 有两种明显不同的3D培养建立模式^[8], 即基于无支架模式和支架模式. 无支架模式的制作方式很多, 如悬滴法^[9], 其制备方法简单、用途广泛, 在药物筛选研究中有广泛应用. 基于支架培养的方式是使用天然或合成生物材料, 为癌细胞提供生长黏附场所, 并提供特定生物学特征的研究方法(如细胞迁移、肿瘤转移及血管化等). 从建立相对完整TMEs结构的角度来看, 许多TMEs中的成分支持支架培养模式. 例如, 肿瘤细胞外基质(extracellular matrix, ECM)环境中既存在细胞与细胞之间的连接, 也存

引用格式: 罗升昌, 王颖, 王士斌, 等. 基于微流控技术构建3D肿瘤模型用于药物筛选. 科学通报, 2021, 66: 4395–4410

Luo S C, Wang Y, Wang S B, et al. Construction of 3D-tumor model for drug screening: Application of microfluidics (in Chinese). Chin Sci Bull, 2021, 66: 4395–4410, doi: [10.1360/TB-2021-0245](https://doi.org/10.1360/TB-2021-0245)

在细胞和基质成分的连接;并且,ECM受肿瘤发展过程影响,比无支架培养模式更容易克服。最近,组织支架材料的相关研究认为,支架系统相比于无支架培养有独特优势。如Li等人^[10]提出一种使水凝胶与钛、钢、镍、钽、银、铝等多种金属表面具有强附着力的简单而通用的方法,并实现了水凝胶细胞支架与金属材料的高强度黏附。该研究表明细胞支架材料在设计复杂和动态的环境中具有优势。

尽管如此,支架培养模式仍存在问题,如大部分支架系统在静态3D培养时无法通过外部环境动态调控细胞生长状态或在特定微尺度的支架特性,如均一性无法可控,不能更好地模拟体内肿瘤及TMEs。近年来,微流控技术受到越来越多的关注,其优点包括方便进行细胞操作,可实现细胞与细胞间作用的控制以及可集成多种分析技术,这些优点使微流控技术能够被用于实时动态的细胞学研究^[11]。支架材料特性和微流控技术的结合能够在一定程度上较好地实现体外模拟3D肿瘤模型。如Nashimoto等人^[12]提出用多细胞芯片肿瘤平台评估肿瘤活性与血管内流动的工程肿瘤网络。在该系统中,细胞聚集体内的成纤维细胞诱导血管新生芽,构建成为可灌注的血管网络,培养过程中保持了工程血管网液体流动的充盈。灌注24 h以上,结果显示拟球体肿瘤细胞增殖活性明显增强,细胞死亡数目减少。灌注给药无明显的剂量依赖性,表明体外血管网络中血流对肿瘤活性评估以及药物筛选作用的重要性。

当前,微流控技术在3D肿瘤药物筛选上取得了很

多研究进展,但对微流控技术和3D肿瘤培养支架材料在药物筛选领域应用的关注较少(图1)。本文结合支架培养系统,综述了支架培养材料(包括合成材料和天然材料)和微流控技术结合用于控制仿生TMEs药物筛选的进展,为相关研究提供参考。为了清楚认识TMEs对肿瘤行为的影响,结合文献讨论在TMEs中细胞成分、非细胞成分和肿瘤细胞发展的关系,阐述提高体外模拟药物筛选模型的必要性;并综述微流控技术与3D支架结合构建药物筛选模型的研究进展。

1 TMEs的细胞作用与非细胞作用

TMEs可提供肿瘤生长增殖以及转移相关的条件(图2),包含基质细胞,其中也存在该类型肿瘤ECM^[13]。具体来说,除肿瘤细胞外,TMEs中有几种不同的免疫细胞类型:血管细胞(周细胞和脂肪细胞)和肿瘤相关成纤维细胞(tumor-associated fibroblast, TAFs),这些基质细胞与肿瘤细胞相互作用。另一方面,ECM的理化特性与肿瘤细胞、基质细胞也相互影响,ECM对细胞分化、核成分和基因表达存在作用,以及在癌症发展进程中影响着基因的表达和染色质组织的改变。相应地,3D细胞培养过程中,ECM组成对细胞行为影响很大,如TMEs中经常产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)等化学物质,可能导致氧化应激。细胞外ROS会被抗氧化蛋白清除,如在TMEs中,低水平表达的过氧化氢酶或超氧化物歧化酶将导致大多数癌细胞高水平氧化应激。氧化应激表现为细胞内的DNA损伤,然而当

图1 (网络版彩色)基于微流控技术的肿瘤药物筛选研究进展示意图

Figure 1 (Color online) Scheme of the advances in microfluidic-based tumor models for drug screening

图2 (网络版彩色)体内肿瘤微环境
Figure 2 (Color online) Tumor microenvironment *in vivo*

基质中存在ROS时,会在基质成纤维细胞激活后影响ECM的刚度。刚性通常因活性氧的存在而增加,导致实体瘤具有内在异质性和结构复杂性。

TMEs中,其他非肿瘤细胞可与肿瘤细胞相互接触、相互作用,从而影响肿瘤细胞的发展^[14]。内皮细胞(endothelial cells, ECs)、TAFs和免疫细胞在大多数类型的肿瘤环境中存在,对肿瘤细胞耐药性有所影响^[15,16]。研究者对28种不同的免疫细胞类型进行了肿瘤浸润方面的研究^[17],结果显示免疫浸润成分在肿瘤的每个阶段都发生变化,表明免疫细胞对肿瘤发展有重要影响。TMEs中的免疫细胞能够增强恶性肿瘤细胞的增殖、迁移和转移^[18-20],ECs是血管的主要细胞成分,在TMEs中可被肿瘤细胞诱导生成新血管,也参与恶性肿瘤细胞转移^[21,22]。肿瘤-ECs的相互作用对于微

环境生理或病理影响较大,如血管生成、癌症转移和定植等,肿瘤细胞和ECs之间的作用可通过旁分泌/并置作用影响肿瘤生长和进展,并诱导癌症治疗过程中的耐药性。Lin等人^[23,24]在之前工作的基础上将蛋白检测系统和样品预处理系统与扩散共培养体系集成,分析了癌细胞在该扩散体系中及不同刺激下的生长(图3)。这类微流控技术的发展使得精确构建具有高时空分辨率的生理相关微环境成为可能,促进了体外微流控装置内细胞行为的研究。共培养装置通过细胞培养室的合理设计和微通道的连接,能实现不同细胞培养室之间可扩散因子而非细胞之间的实时交换。TAFs在TMEs中比正常成纤维细胞增殖更快,产生更多ECM,分泌独特的细胞因子,提高致癌效应^[25,26]。与正常的细胞微环境相比,TMEs表现出明显不同的免疫细胞动力学。总之,构建体外肿瘤模型时,有必要注意细胞与细胞的相互作用,用于指导药物筛选。

TMEs内部各种细胞暴露于不同程度的化学梯度和物理作用,其影响癌细胞特性以及基质细胞功能,导致TMEs结构存在生物/表型区^[14,27]。癌细胞的快速过度增殖可在肿瘤内形成空间梯度,阻止血液正常流动,形成致瘤低氧环境,减少了肿瘤对药物的有效暴露^[28]。在体外模型中,生理氧气水平的复制是人体生理和病理建模的基础。应用于大多数体外模型中的环境氧气条件不能很好地模拟细胞在体内经历的氧气条件,而实体肿瘤表现出区域缺氧水平,促进肿瘤进展,同时抵抗药物治疗效果。该现象为癌症治疗提供了一个特定靶点,但合适的体外针对性研究方法还需要进一步探索。微流控平台可以设计较为直接地实现TMEs特征的理

图3 (网络版彩色)用于药物筛选的集成微流控装置,其过程包括:细胞共培养、蛋白监测和质谱检测预处理^[23]
Figure 3 (Color online) Integrated microfluidic devices for drug screening, comprising cell coculture, protein detection, and pretreatment before mass spectrometry detection^[23]

化条件. Fridman等人^[29]开发了一种多层微流控装置, 将高通量产生的3D肿瘤球体与5个不同氧气条件的线性梯度耦合在一起, 从而在单个芯片上实现多种条件检测和数百次实验复制. 可控的环境条件使TMEs能够在一定程度上设计药物作用模型, 并且肿瘤内皮血管系统的构造对气体供应、系统与局部生长调节因子、代谢物质以及pH都有影响^[30]. 当前, 有许多3D培养模式可以很好地实现TMEs中细胞与细胞的相互作用或者细胞与非细胞的相互作用. 在药物筛选领域, 如肿瘤类器官(patient-derived organoids, PDOs)是将患者原发性肿瘤组织中的癌细胞分离, 选择合适的生物材料模拟TMEs进行培植, PDOs高度模拟了个体肿瘤的异质性, 适用于个性化治疗.

总之, TMEs内部作用机制要求体外药物筛选模型必须综合考虑构建体系, 用合适的方法或材料来达到能在体外模拟药物反应的目的.

2 支架材料及其在微流控技术中的应用

2.1 支架材料的分类与评价

近年来, 随着TMEs研究的深入^[31~34], 越来越多的3D肿瘤支架培养模式被提出. 表1总结了两种不同来源支架材料结合微流控技术应用于TMEs的研究.

肿瘤支架由不同材料制备而成, 常用的天然支架材料, 如Matrigel, 是从EHS(engelbreth-holm-swarm, EHS)小鼠肿瘤中提取得到的基底膜基质胶(basement membrane matrix, BME), 主要成分有基质金属蛋白酶、胶原蛋白以及生长因子等. 基质胶聚合形成具有生物活性的3D培养基质, 在其中培养肿瘤细胞等, 用以研究细胞形态、迁移以及基因表达等. 相比于合成支架, 其天然来源可以更好地模拟体内TMEs. 并且, 不同细胞类型3D培养模型中, Matrigel可作为研究的黄金标准. 如Ng等人^[42]以Matrigel为阳性对照, 使用一种合成酶交联水凝胶来定义机械和生化性质, 并假设维持结肠癌类器官与这两方面因素有关, 证明了明胶基水凝胶在体内支持结肠癌类器官肿瘤生长, 在体外对各种结肠癌治疗药物类器官的敏感性与传统Matrigel基本相当, 为药物筛选增加了一种工具. 与大部分天然材料存在的问题相似, 天然材料在制备过程中经常发生批次变化, 因而存在成分不可控的复杂性, 使其很难确定促进细胞功能的信号. 而合成材料支架克服了传统天然生物材料存在的批次及实验结果不一致的问题,

而且能够为化学手段调节支架的生物化学特性提供较大空间. 例如, 虽然与Matrigel等天然材料不同, 水凝胶不具有内源生长因子, 也无法很好地呈现体内组织类似异质性、相关可溶性因子分布和成像特性^[43]; 但是水凝胶具有较高的含水量, 能够允许氧气、代谢废料以及其他可溶性物质转运.

2.2 微流控技术用于制造细胞培养支架

支架材料培养前的加工, 往往影响接种细胞在材料上的行为. 微流控通道中流体可控且稳定, 材料可在该可控工艺条件下制造可重复性样品, 用于构建肿瘤药物筛选模型. 流体通道直径使雷诺数相对较低, 有利于形成层流, 可控制微流体产生纤维结构, 即微流控纺丝(microfluidic spinning, MFS). 常见MFS的基本原理是芯层流体和鞘层流体通过两个通道在交接处相互接触时同心流动. 气体、液滴和细胞微球已被证明可实现MFS. 如图4所示, 以可控流体为模板制备中空通道超细纤维, 可作为编织、绕丝或3D打印制造复杂且可灌注结构的重要方法^[44]. 细胞可直接包裹在可灌注管状材料中, 形成充满细胞的血管导管, 不需要细胞后接种过程. 该思路能很好地利用支架材料体外制造仿生可灌注血管化结构, 进一步构建肿瘤药物筛选模型. Yu等人^[45]较为系统地提出用于纺丝生物活性(细胞负载)微纤维的毛细管微流体设计, 包括3种类型微流控系统的组装: 用于均匀微纤维纺丝的简单注射毛细管微流控系统, 用于纺丝核壳或纺锤结结构微纤维的分层注入毛细管微流体, 以及用于多组分微纤维纺丝的多管注射毛细管微流体. 如前所述, 这些生物活性微纤维的不同形态可以进一步组装成与组织中的层次结构相似的高阶结构, 进而可用于构建复杂灌注环境的肿瘤组织.

海藻酸盐具有快速离子交联能力、机械稳定性和生物相容性好的优势, 是MFS应用最广泛的水凝胶材料之一. Yao等人^[46]研究了一种简单的基于微芯片的MFS工艺, 用于制备多相海藻酸钙微纤维. 培养基加入壳聚糖可以保持纤维结构稳定, 包埋多种细胞, 如人非小细胞肺癌细胞、人胎肺成纤维细胞、正常肺支气管上皮细胞、人脐静脉内皮细胞等, 在材料上可进行21 d体外3D细胞共培养. 该方法简单且易于操作, 连续产生空间明确的非均匀微纤维, 在药物筛选上有很大的应用潜力. 基于微流控通道可设计性和海藻酸在有钙离子存在时的快速交联特性, 不同细胞组成结构在微流控通道中可控制备. Chen等人^[47]在液滴微流控平台上

表 1 用于微流控技术的天然材料和合成材料

Table 1 Natural and synthetic materials for microfluidics

材料	细胞	方法	结论	文献
天然材料				
壳聚糖	HCCLM9 肝癌细胞	壳聚糖为模板, 构建多糖纤维素基微管, 获得透明多孔弹性的人工血管用于复制肿瘤细胞经血管迁移	肿瘤细胞在人造血管中的黏附和经血管迁移得到了很好的复制	[35]
蚕丝	HCT-116人结肠癌细胞	在3D动态模型中, 测试了不同力学性能的酶交联丝素水凝胶在不同微环境下对结直肠癌细胞迁移的能力	两种生物材料和两种迁移模型在水凝胶的力学性能和模型的内在特性方面存在深刻的差异, 能够在响应微环境的3D基质中精确可视化癌细胞的迁移	[36]
明胶	A549腺癌人类肺泡基底上皮细胞	四通道聚焦微流控装置中, 混合表面活性剂的明胶溶液和微生物转谷氨酰胺酶包裹癌细胞悬浮液, 构建酶交联明胶微泡细胞支架	细胞支架诱导细胞死亡所需的吉西他滨有效浓度明显高于2D培养, 且处理时间更长	[37]
合成材料				
聚乳酸	MG63骨肉瘤细胞	一种微流控装置, 材料为生物相容性聚合物聚乳酸, 该装置使细胞能够在不同的流态下培养, 包括灌注和扩散	拓扑微观结构特性影响细胞的扩散和分布	[38]
聚乳酸-羟基乙酸共聚物	A549非小细胞肺癌	共聚物电纺丝纳米纤维为细胞支架的简易肺芯片, 用于模拟肺泡微环境	纳米纤维支架可比较接近模拟体内3D细胞培养环境, 在可控厚度的共聚物膜上实现了细胞的共培养, 借助吉非替尼测定该环境中癌细胞的生存能力	[39]
聚乙二醇	MDA-MB-231乳腺癌细胞	经纤维连接蛋白衍生黏附肽模拟物SynKRGD修饰的聚乙二醇基水凝胶来产生整合素介导的细胞-支架相互作用, 研究进入休眠状态的乳腺癌细胞的炎症表型和比例以及对标准化疗的敏感性, 并比较标准硬质聚苯乙烯支架和软水凝胶支架结果	水凝胶支架显著增强了乳腺癌细胞的休眠, 维持了更健康的肝微环境, 而肝微环境对炎症反应更敏感	[40]
明胶丙烯酸甲酯	HepG2肝癌细胞	一种用于制备核壳微凝胶的流动聚焦微流体装置	微凝胶可实现肝细胞15 d的细胞活性, 并成功用于共培养干细胞和血管内皮细胞	[41]

图 4 (网络版彩色)各种中空微纤维基及基于微纤维的三维构造^[44]。(a) 微流控同轴装置示意图(i)和微流控装置中同轴流动的形成(ii)。(b) 具有花瓣、纺锤体和半球状结节的中空微纤维的生成(从左到右)。(c) 生成具有多个中空通道和间隔的微纤维器件设计方案, 以及生成的微纤维横截面图。(d) 具有螺旋通道中空水凝胶微纤维。(e) 由两根微纤维打成的结。(f) 编织在一起的3D组织。(g) 通过卷曲具有直折通道中空微纤维制成的坚韧水凝胶管的荧光图像。(h) 由中空微纤维构建的生物打印多层结构荧光图像

Figure 4 (Color online) Diverse hollow microfiber building blocks and the 3D constructs based on microfibers^[44]. (a) Scheme of a coaxial microfluidic device (i) and coaxial flow formed in the microfluidic device (ii). (b) Generation of hollow microfibers with petal, spindle, and hemispheric knots (from left to right). (c) Scheme of the device design for the generation of the microfiber with multiple hollow channels and compartments, and the cross-section view of a generated microfiber. (d) Hollow hydrogel microfiber with a helical channel. (e) A knot assembled by two microfibers. (f) The woven 3D tissues. (g) Fluorescence images of tough hydrogel tube made by coiling the hollow microfiber with straight-folded channels. (h) Fluorescence images showing bio-printed multilayer structures built by hollow microfibers

制备得到外层包成纤维细胞、内层包肝癌细胞的精巧结构,实现了均匀化产生异质性拟球体,可用于研究肿瘤与基质细胞的相互作用。同时,单分散性拟球体能够用于药物高通量筛选,相比于传统2D高通量筛选更贴合实际抗癌药物作用效果。Zheng等人^[48]的类似工作将ECs与肿瘤细胞在海藻酸微流控液滴内共培养,同时检测动态过程中的细胞行为。结合第1节提到的质谱预处理方法,该工作可与质谱结合提供细胞行为定性和定量分析。与传统的细胞培养方法相比,基于微载体的3D技术在细胞通信、细胞极化、基因表达、细胞生长的微环境等方面更接近于体内组织,稳定性更高,寿命更长,更适合长期的细胞研究。与长期频繁口服或注射的传统给药方式相比,基于微载体的给药系统可以通过药物的缓释来更好地控制药物水平和改善药代动力学。Liu等人^[49]受鸡蛋清受热变性启发,设计制造了一种新的微流控“烹饪”方法,生成用于细胞培养和药物传递的卵微载体。处理得到的微载体在100 μm ~1 mm的范围内具有高度单分散和均匀的形貌。卵微载体实现了良好的细胞黏附生长效果,冻干加工后形成内部通道相通的多孔微载体形貌有利于设计复杂肿瘤病灶结构。此外,传统的血管蒂组织外科移植手术复杂,易形成疤痕及发生感染风险,适用性受到限制。Chen课题组^[21]使用由海藻酸钠/明胶组成、用于生成血管的支架,内含可增殖ECs。制备过程中使用带有扩展腔的双T结构微流体装置,实现原位微创血管的形成。这种具有可注射性、包含肿瘤细胞的支架材料,可用于原位构

建动物模型,减少手术操作的影响。在可注射性的支架材料研究中,本课题组^[50]提出借助复乳溶剂挥发法在微流控结构中制造聚乳酸-羟基乙酸大多孔微球,用于包藏增殖的骨成肌细胞,提供良好微环境,并且细胞与细胞外基质紧密排列成细长形状,使细胞黏附和增殖得到促进,增强了肌原分化。在之后的异质性肿瘤模型构建中,将ECs、肝癌细胞与聚乳酸-羟基乙酸大多孔微球共培养,得到内皮化的肿瘤组织,建立了一种血管化的肿瘤微组织^[51]。不可控的内部孔洞通道以及静态支架材料缺乏对外部环境的刺激响应性,使得此类支架只能直接提供刚性结构,这与实际的细胞外环境不同。Shao等人^[52]利用同轴微流控装置制备得到水包油(water-in-oil, W/O)结构的微球(外层连续相为氧化石墨烯和N-异丙基丙烯酰胺分散溶液,内层硅油作为分散相),将若干微球累积叠放为类似最紧密堆积的六方体,洗去硅油得到红外光控制动态收缩的孔洞支架结构。该结构的可控收缩特性能够仿生海洋生物滤食过程,有效提升细胞在支架生长的密度。体外构建的TMEs密实结构往往主要借助较长时间的细胞生长,以此类工作富集细胞的特性能够较好地建立密实肿瘤结构。

3 支架材料结合微流控技术特征模拟TMEs

TMEs特性构建有助于肿瘤药物筛选的进行,为了说明微流控技术在肿瘤模型建立的优势(图5),本节介绍了近年来利用支架材料建立TMEs特性药物筛选模型的相关研究进展。

图5 (网络版彩色)微流控技术构建体外肿瘤微环境。(a)实体瘤病理微环境细胞分布。(b)基于微流控芯片的肿瘤微环境模拟
Figure 5 (Color online) Establishment of tumor microenvironment *in vitro* using microfluidic technology. (a) Cell distribution in pathological microenvironment of native tumor tissues. (b) Simulation of the native tumor microenvironment based on the microfluidic chips

3.1 灌注和血管化

借助流体输送可实现TMEs液体灌注要求,也可通过细胞和支架结合形成微血管,研究TMEs内部的血液循环。灌注培养往往是为了精准控制药物测试含量和营养供应水平,实现体外药物学研究。此外,血管循环系统作为肿瘤转移的一个重要部分,也可借助灌注特性进一步进行构建研究。

3.1.1 灌注

实体瘤中肿瘤细胞快速增殖,体内部分肿瘤血管被压迫,血管生成异常。异常血管对肿瘤细胞生长影响很大,并且微环境整体相对正常组织杨氏模量偏大,不易发生形变,内部未被压缩血管网络处于高渗状态。过多液体穿过血管壁,导致TMEs组织间流体压力增加,一方面影响细胞与非细胞功能和成分的变化;另一方面阻止药物向肿瘤内部传递^[53]。因此,能够反映灌注不足液体压力的研究模型的建立,对体外肿瘤生物学重要性不言而喻。现有3D药物筛选应用中,有两种常见灌注平台:生物反应器和微流控芯片。

微流控技术已实现构建工程血管灌注网络肿瘤模型。Cao等人^[54]建立了一种拥有血液和淋巴血管肿瘤芯片平台,将其嵌入微流控生物反应器中,构造一个培养乳腺癌细胞的动态培养微环境。乳腺癌细胞被包裹在甲基丙烯酰化明胶(methylacryloyl gelatin, GelMA)3D培养基质支架中。这种独特的体外肿瘤模型包含生物打印血管和淋巴管,可模拟某些药物化合物在TMEs中的复杂运输机制,提高癌症药物筛选准确性。TMEs药物递送研究中,微流体平台建立多组织串扰作用是可行的,借助灌注条件可仿生体内药物循环对机体的影响。Ozkan等人^[55]利用胶原构建乳腺癌、乳腺癌与健康肝脏微环境,在微流控芯片微环境中描述血管化组织,研究粒子动态与空间运输、动态监测血管通透性,测量药物和纳米颗粒运输,评估相关疗效及对健康肝脏的毒性,也探讨颗粒尺寸对微环境中时空扩散的影响。既独立于不同微环境序列中颗粒的循环,又响应于颗粒循环。实验结果与类似体内研究一致,表明体外灌注条件的TMEs结构的复杂性可在体外进行模拟制造。此外,流体长期灌注使研究者开始关注TMEs微血管网的形成。在体外形成可灌注微血管也是癌症组织工程的目标之一。Kim等人^[56]开发了一种允许营养物、化合物、生物分子和细胞悬浮液以及流动诱导的机械刺激进入血管化管腔的细胞。该细胞表现出对生理剪切应

力的相应反应,如细胞骨架重排和一氧化氮合成的增加,丰富了血管生理学研究。微通道官腔内部同时也可接种ECs,在形成血管-肿瘤模型通道后,进行各类药物作用测试。一方面验证血管-肿瘤相互作用的动态过程,另一方面较为精准地评价药物作用效果。Zhang课题组^[57]将发光的叶酸靶向性纳米粒子结合到叶酸过表达肿瘤细胞;同时由于颗粒中趋化因子的存在,进一步通过一个完整的ECs屏障使树突状细胞和T细胞从血管腔隙靶向迁移到肿瘤区域,所制备的靶向纳米颗粒不会造成白细胞毒性,不会引起溶血和激活血小板或凝血系统。该特点是普通2D模型和3D静态模型无法直接实现的。如图6所示,与传统侵袭小室系统Transwell不同,微流体系统中的流体扩散是横向的,重力对纳米颗粒运动和叶酸靶向性设计的影响被最小化。在该装置的肿瘤生长区域,尽管在灌注环境下营养物质或药物递送较快,但肿瘤细胞生长速度较快,2D环境仍不能充分反映复杂的3D肿瘤环境。因此需要进一步通过渗透性较好的支架材料进行处理,使得灌注靶向纳米粒子或药物的效果符合TMEs结构特点。Zheng等人^[58]构建了一个3D的肿瘤-ECs共培养模型,用于模拟肿瘤治疗过程中的耐药性。他们首先制备不同细胞微囊化的海藻酸盐微载体胶囊用于3D共培养,之后实现了在线灌注培养和芯片上持续药物刺激,预处理后再用质谱法进行药物代谢检测。培养过程实现了对3D肿瘤结构持续的药物刺激,质谱检测结果表明单独培养和共培养模型的药物吸收有显著差异。这类集成式微流控技术是一种高通量、高灵敏度的方法,在药物毒性和药物筛选领域有较强的可操作性。

3.1.2 血管化

肿瘤细胞持续生长依赖血管的持续生成和通过血管侵入其他器官。许多现有抗癌药物靶标是肿瘤血管生成的相关过程,例如贝伐单抗。传统2D培养的非自然状态扩散表型与3D培养的接近体内肿瘤形态的圆形和聚集型不同,肿瘤细胞表现出药物敏感差异。此外,3D静态生长的肿瘤缺乏血管化结构以实现营养递送^[59]。

微流体装置可实现血管生成、癌细胞迁移等研究,可以分为两类:(1)将ECs黏附于微模式化材料结构;(2)利用自然形态形成过程在微流体装置内通过空间控制材料形态生成微血管^[60,61]。两种范式提供预防药物渗入聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)壁内,也提供血液循环条件以及建立血管,通过内皮屏障外

渗实时监测形成过程. 表2进一步细化相关研究方法, 即单层ECs覆盖(平面或圆管面)、可灌注且具备循环功能的血管网.

微流控装置可较为直观地研究肿瘤血管再生影响因素. Miller等人^[64]将原发性人肾透明细胞癌细胞与人ECs在血管化、血流定向、3D培养系统中结合, 原发性肿瘤细胞在3D微流控系统中诱导ECs萌发. 当肿瘤嵌入工程血管周围基质时, 持续的血流可驱动ECs萌发, 装置模拟人肾透明细胞癌细胞和ECs关键血管生成信号通路. 这种诱导萌发表型是由原发肿瘤细胞衍生血管生成生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)积累的生化梯度驱动, 可相应地在微流控装置中对其药理封锁, 达到对萌发效果的控制. Buchanan等人^[65]在I型胶原蛋白接种入乳腺癌细胞构建微流控肿瘤血管模型, 研究了正常、低和高微血管壁剪应力对血管生成相关肿瘤内皮旁分泌信号传导的影响, ECs通

透性随着微血管壁剪应力增加而降低, 与肿瘤细胞共培养相对于单一培养的通透性增加. 这可能是由于剪切应力介导的ECs排列和肿瘤血管VEGF诱导的通透性改变. 此外, 基因表达分析显示, 高微血管壁剪应力显著下调肿瘤表达血管生成重要因子, 如基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinases-9, MMP-9)、缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor, Hif-1). 该结果在肿瘤单独培养或静态条件培养实验中均未被观察到, 表明一种流动介导的旁分泌信号机制存在于肿瘤细胞周围, 引起血管生成因子表达变化, 证实了灌注条件对肿瘤血管再生的影响.

正常微血管ECs间隙比较致密, 结构没有被破坏, 一些药物分子不易通过血管壁. 实体瘤结构中, 血管间隙相对较宽且结构不够完整, 对颗粒具有选择性、高渗透性以及阻滞作用, 即实体瘤的高通透性和滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR). 通

图6 (网络版彩色)肿瘤靶向性药物的横向扩散平台^[57]. (a) 扩散平台的实物图. (b) 血管-肿瘤界面相互作用的微流控芯片示意图. (c) 明场观察下内皮细胞和癌细胞的共培养. (d) 内皮细胞间的细胞黏结蛋白荧光染色观察. 标尺为100 μm . (e) 通过z-Stack分析验证内皮细胞通道的形状. 标尺为100 μm

Figure 6 (Color online) Horizontal diffusion platform for tumor-targeted drugs^[57]. (a) Profile display of the diffusion platform. (b) The tumor-vascular interface model in a microfluidic device. (c) Co-culture of ECs and tumor cells in bright field. (d) Observation of the cell adhesion protein staining among ECs. Scale bar is 100 μm . (e) Shape of the ECs channel verified by z-Stack analysis. Scale bar is 100 μm

表2 基于微流控技术的TMEs血管化

Table 2 Vascularization in TMEs based on microfluidics

方法	培养液更新	材料	3D培养细胞	文献
单层内皮细胞	灌注	基质胶	T47D, PC9, HMVEC	[59,62]
圆形内皮细胞管	灌注	壳聚糖、胶原	HUVECs, HCCLM9	[35]
血管网	灌注	GelMA、海藻酸、PEGDA	MCF-7, HUVECs, HLECs	[54]
	直接换液	纤维蛋白原、I型胶原	HUVECs, NHLFs, HL-60, U87MG	[56,63]

过血管材料与肿瘤组织共培养,再借助微流体剪切力作用促使血管再生,可作为探讨EPR的研究工具,解决药物递送问题。Tang等人^[66]在3D环境下共培养肿瘤和ECs,结构包括1个血管腔室,其特征是由ECs培养网状血管在剪切流作用下形成完整管腔。与在肿瘤腔室培养的3D实体肿瘤相连接,模拟药物EPR效应,研究了细胞-细胞以及细胞-药物载体相互作用和肿瘤药物的快速筛选,并对EPR相关问题给出可执行思路。胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是成人中最常见和最致命的脑瘤之一,该肿瘤复发部分是由原发性脑肿瘤中的胶质瘤干细胞(glioma stem cell, GSC)群体驱动的。GSC通常集中在已经存在的血管周围特定生态位附近,被称为血管周围生态位。坏死区域被称为坏死周围或缺氧生态位,这些特殊的生态位保护、维持和调节GSCs的表型、侵袭和治疗性耐药性。血管周围龛内的细胞-细胞相互作用涉及附近血管ECs释放的可溶性因子,导致GSCs的自我更新和脑肿瘤在体内的增殖。为了更好地理解血管生态位和细胞-细胞信号传导的作用,Danh等人^[67]制作了一个与水凝胶基生物材料集成的3D器官型微流控平台,用于模拟GSC血管生态位,研究ECs对患者来源的GSC行为影响,并识别介导其侵袭和表型的信号线索。所建立的微血管网络增强GSC在3D水凝胶中的迁移,促进侵袭性形态,且维持GSC的增殖率和表型。此外,将平台上发生的迁移行为与体内小鼠模型进行比较,发现了类似的侵入形态,一定程度上印证了该微流控系统可以代表一个生理相关的TMEs。利用拮抗剂证实了CXCL12-CXCR4信号参与促进3D血管微环境中GSC的侵袭,同时也证明了微流控作为药物筛选试验的有效性(CXCL12-CXCR4信号轴在GBM和其他几种人类癌症(如乳腺癌、结肠癌、胰腺癌、卵巢癌和前列腺癌)的肿瘤发生中起着核心作用)。这种可根据病人肿瘤特征进行设计的方法在满足模型特征的同时可实现作用模型的效果。

3.2 化学和氧气浓度

流体通过扩散或对流产生化学梯度,以扩散方式建立微流体平台产生浓度梯度,利用液体灌注或者调节水凝胶腔。大多数基于对流的装置是梯度发生器,其中几种特定化学浓度是由混合不同量流体产生的,该特点可以应用于药物筛选、测试不同药物梯度、研究培养细胞反馈。Al-Abboodi等人^[68]将明胶羟基苯丙酸和羧甲基纤维素酯胺共轭组成水凝胶,生物相容性纤

维素酶以空间控制方式在水凝胶中扩散后,纤维素酶对水凝胶中组分的选择性消化会产生孔隙梯度,而不是在水凝胶合成过程中形成孔隙梯度,显示出基于水凝胶在模拟体内3D微环境中组织工程和诊断的应用潜力。Del Amo等人^[69]设计了3个相邻腔室来引入水凝胶,通过使用嵌入在3D胶原基质中的真皮人类成纤维细胞进行测试,从而产生胶原蛋白浓度的阶梯梯度装置。

由于氧气扩散问题,大直径肿瘤拟球体中心区域会形成坏死区域。虽然在非常小的肿瘤中,缺氧可能是轻微的,甚至不存在,但是较大肿瘤会由于不正常条件导致氧梯度,从而出现缺氧区域^[27]。与永久性缺氧相比,缺氧与复氧形成氧波动对肿瘤细胞有不同影响,并对肿瘤的进展、应激反应和信号转导有广泛作用^[70]。缺氧导致细胞代谢过程重新编程,主要是由Hif作用,Hif作为一类转录因子使肿瘤细胞对环境氧浓度变化适应性反馈^[71-73]。诱导分泌的缺氧诱导基因产物会促进TMEs发生改变,如血管内皮生长因子A^[74]、促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)^[75]、调节炎症细胞招募与基质细胞衍生因子1 α (stromal cell derived factor-1 α , SDF-1 α)^[76]以及血小板源生长因子B(platelet-derived growth factor-B, PDGF-B)^[77]。低氧培养箱的使用很容易将低氧环境纳入大多数现有系统中。尽管如此,仍无法通过外部空间控制产生氧气梯度,氧气梯度条件的存在允许研究癌症细胞对不同氧气水平反应,因为可以重现氧气分布在实际肿瘤中呈现的抗药性特征。带氧气控制的微流控系统的报道使该问题有了相对明确的解决办法。Chang等人^[78]报道了一种PDMS和聚碳酸酯(polycarbonate, PC)结合使用的微流控平台,其由两层PDMS构成,微流控通道由薄的PDMS膜隔开。顶层包含1个嵌入PC膜和1个蛇形通道,用于限制氧气清除化学反应,在底层细胞培养产生氧气梯度;随后进行48 h基于细胞的药物测试和使用人肺腺癌上皮细胞A549的细胞迁移实验。低氧下,替拉扎明药物细胞毒性激活,A549细胞凋亡增加,说明该装置具有良好的细胞相容性和梯度可控性。此外,A549细胞迁移实验结果显示A549细胞的趋氧行为,提示氧梯度在引导细胞迁移中起重要作用,在趋化因子和氧梯度组合下,迁移结果不能简单地与单一梯度结果叠加。在另一项相似研究中,Wang等人^[79]构建一个含氧梯度的单层微流控装置,用于研究抗肿瘤药物的氧依赖性细胞毒性。纤连蛋白包覆的细胞培养腔内氧浓度是由邻近微流控通道的空间限制的氧清除化学反应控制,PDMS膜的凹槽状结构

可增加与底层的结合能力,避免液体泄漏,有利于细胞培养室与反应通道之间的气体交换.如第1节所述,TMEs中经常会产生ROS等化学物质,并可能导致氧化应激,这是一种与包括癌症在内的多种病理有关的细胞状态.氧化应激表现为细胞内的核酸损伤,基质中存在ROS时,也会在基质成纤维细胞激活后影响ECM刚度.Chittiboyina等人^[80]在开放通道的微流控装置中模拟了该过程(图7),装置中内置的微通道和化学物质通过纸基细胞培养膜(纤维素醋酸酯)扩散形成ROS梯度.与不同成分和刚度的ECM支架接触,ROS梯度能够研究ECM特性对扩散ROS的响应.TMEs中ECM对肿瘤细胞影响最直接的表现解释了过度增殖导致的局部基质力学强度上升,协同相关因素(代谢重编程、TAFs等)影响肿瘤抗药性,模拟相应的特点,借助拮抗剂针对性加药,能够在快速流动的通道中筛选出合适药物作用范围的抗癌药物.

3.3 多细胞共培养

TMEs中ECs、TAFs和免疫细胞对肿瘤细胞抗药性影响较大.其中,ECs主要影响肿瘤转移.TAFs会使ECM沉积上升,也会分泌特定细胞因子作用癌细胞生长.免疫细胞会促进恶性细胞增殖、迁移和转移.因此,很有必要在体外共培养模拟细胞与细胞的相互作用,建立肿瘤模型.微流控平台上建立多细胞共培养模型可分为两种:混合式共培养和分离式共培养.

混合式共培养能够在微流控芯片上模拟肿瘤细胞

异质性生长环境,实际研究过程中很难区分多种细胞.尽管可以通过荧光试剂进行标记,但多色荧光信号相互作用会使实验数据产生偏差.分离式共培养改进了该问题,对于一个分离式共培养系统,不同细胞可在既定位置生长,细胞与细胞相互作用可通过介质流动和扩散实现.支架材料在分离式装置中应用比较广泛,本节将着重关注支架材料在建立分离式共培养模式时的应用.

Bender等人^[81]描述了一个数字微流控平台,其可通过悬滴法形成细胞聚集体,将细胞聚集体包裹在胶原蛋白中并暴露于迁移调节剂环境,在设备上操作胶原溶胶凝胶,形成弹性模量达50 kPa的凝胶.迁移测定实验表明,人成纤维细胞团内的细胞可浸润入胶原凝胶,外源性迁移调节剂传递可以增强或抑制这种浸润,将成纤维细胞球状体暴露于结肠癌细胞聚集体,浸润效果相比之前增加1倍以上,与TAFs表型一致.与2D培养技术相比,数字微流控平台可用于基于细胞聚集体侵袭测定自动化液体处理方案,创建更接近TMEs的侵袭模型.Ke等人^[82]提出一种稳定且静态培养的液流环境,可增强自然杀伤(natural killer, NK)活性,该环境增强NK细胞活性,能动态研究免疫细胞和癌细胞免疫相互作用.借助流体灌注,也可通过分离式共培养提高细胞数量,之后解除空间限制实现混合式共培养,动态监测多细胞基因表达水平.如图8所示,Liu等人^[83]提出一种3D打印塑料材质的微流控渡槽细胞图版技术,直接将肿瘤细胞和成纤维细胞限制在一个标准3D打印渡槽

图7 (网络版彩色)化学成分梯度发生装置的原理图^[80]. (a) 细胞通过开放式培养室置于化学梯度中. (b) 细胞生长由醋酸纤维素纸支撑,并在灌注中扩散ROS浓度梯度

Figure 7 (Color online) Schematic diagram of chemical composition gradient generator^[80]. (a) Cell exposure to a chemical gradient via an open culture chamber. (b) Growth of cells supported by the cellulose acetate paper, and perfusion in diffusion of the ROS concentration gradient

图 8 (网络版彩色)塑料砖样装置及实验管道原理图^[83]. (a) 塑料砖样装置包括两部分: 底部堰砖有9个堰; 渡槽顶部砌砖3层, 每层砌砖上有3个垂直秸秆状构造. 由于物理分区, 不同类型的细胞可以播种在底部的特定区域. 顶部渡槽砖释放后, 利用显微延时成像技术进行动态表型分析. 取出少量细胞进行分子生物学分析, 如qPCR和RNA-seq. (b) 安装在一个标准的35 mm培养皿内的塑料砖样装置, 用一元硬币作为比例. 顶部渡槽砖用红色聚乳酸打印, 底部井结构采用半透明聚乳酸打印. (c) 撤出装置后, 肿瘤细胞(中间部分)与成纤维细胞(外围部分)互相作用. 标尺为500 μm . (d) 通过使用另一个塑料砖样装置形成一个“太极”细胞图案. 标尺为2 mm

Figure 8 (Color online) Schematic of plastic brick-like device and experimental pipeline^[83]. (a) The plastic brick-like device contains two parts: the bottom weirs brick with nine weirs; three top aqueduct bricks, each brick with three vertical straw structures. Due to the physical partition, different types of cells can be seeded at specific regions on the bottom. After the release of the top aqueduct bricks, dynamic phenotypic analysis can be achieved by microscopic time-lapse imaging. A small number of cells were then retrieved for subsequent molecular biological assays such as qPCR and RNA-seq. (b) Assembled plastic brick-like device that mounted inside a standard 35 mm culture dish, with a Chinese one-yuan coin for scale. Top “Aqueduct” bricks were printed using red polylactic acid, and the bottom well structure was printed using semi-transparent polylactic acid. (c) Interaction of tumor cells (middle part) and fibroblasts (outer part) after withdrawing the device. Scale bar is 500 μm . (d) A “Tai Chi” cell pattern was formed by using another plastic brick-like device. Scale bar is 2 mm

组件中, 允许使用移液器接种-吸取的多细胞模式, 并可通过拆卸进行迁移试验, 重现转移肿瘤的生态位. 在该装置中, 多细胞相互作用可反馈癌细胞与基质细胞相互作用, 装置体系是类体液环境, 不是细胞外环境, 可通过将细胞置入支架材料, 多条件刺激实现肿瘤细胞体外模型建立.

4 结论与展望

TMEs内部相互作用提醒研究人员, 设计体外药物

筛选模型时应注意各种理化因素、细胞与细胞、细胞与非细胞基质相互作用. 在机体循环系统中, 实体瘤受相关激素水平、营养物质递送以及药物治疗作用的影响, 支架培养借助材料特性已实现TMEs中的相互作用, 但不能充分反映一些肿瘤发展特征. 例如, 前列腺癌受性激素影响. 借助微流控技术传质方式, 可相对完整地结合支架材料特性和微流控技术优点, 微制造体外多细胞3D共培养体系; 借助微流体的可控性, 控制肿瘤发展、药物反馈. 在微流控芯片上, 连续灌注特性能明

显提升3D培养模式仿真目的和药物筛选应用。一方面, 由于肿瘤细胞快速增殖, 部分肿瘤血管网在TMEs中被压缩, 导致血流缓慢, TMEs血管生成异常。而其余未压缩血管网带有高透膜, 过多液体穿过血管壁, 组织间流体压力增加, 来自血管网络增强的机械应力影响肿瘤细胞浸润表型, 阻止药物向肿瘤传递^[84,85]。另一方面, 微流控技术有望模拟其复杂的功能结构, 通过微量液体对流体所传质物质进行操作。描述流体特征的雷诺数是通道形状、流体流速和黏度的函数, 根据雷诺数值, 可确定微通道中流体是受黏滞力控制的层流。层流形式流体中的传质颗粒与流动方向平行。层流中, 药物颗粒无惯性流动特征, 实现时空精准测试药物剂量。此外, 溶质在所灌注流体中受到局部扩散作用, 借此可以对培养细胞精准干预, 将灌注药物递送至有限亚细胞间隔^[86,87], 有利于药物先导物筛选工作。

利用微流控纺丝或微流体制造得到的纤维或者多孔支架存在该类型支架的相同问题, 如纤维状支架、多孔微球支架等, 纤维支架上生长的细胞通常不被认

为是真正的3D培养, 因为细胞通常沿着纤维黏附、拉长。此外, 多孔支架往往因为孔洞大小限制细胞生长和代谢成分扩散。当前有一些方法解决了这些障碍, 如利用微流控技术制造的纤维支架可以在支架上原位沉积ECM。Dikici等人^[88]在预制支架上培养骨细胞, 使骨细胞沉积ECM。之后, 通过脱细胞处理在支架上培养干细胞, 考察细胞附着、细胞活力和成骨分化, 从生长效果可知这种支架后处理可使细胞在接种后快速附着生长, 有效改善非ECM环境下细胞生长环境问题。Xu等人^[89]利用微流控技术制备大孔海绵结构的聚乳酸多孔微球, 将重组人可溶性肿瘤坏死因子II型受体载入牛血清蛋白纳米粒子后接枝在微球支架上, 原位注射骨髓部位调整细胞外基质稳态, 在抑制椎间盘病变上有较好效果。相信在未来研究成果中, 借助微流控技术和材料学方法, 可以更好地模拟TMEs, 并且在此基础上对TMEs模型进行体外研究。综上所述, 基于微流控技术中构建的支架系统将为组织工程和药物筛选提供一个可靠、可控的研究平台。

参考文献

- 1 Brancato V, Oliveira J M, Corrello V M, et al. Could 3D models of cancer enhance drug screening? *Biomaterials*, 2020, 232: 119744
- 2 Prasad V, Mailankody S. Research and development spending to bring a single cancer drug to market and revenues after approval. *JAMA Intern Med*, 2017, 177: 1569–1575
- 3 Huang S, Xu C, Zou X H, et al. Ethics research progress of laboratory animal (in Chinese). *Med Recap*, 2015, 21: 66–68 [黄山, 许畅, 邹旭辉, 等. 实验动物伦理研究进展. *医学综述*, 2015, 21: 66–68]
- 4 Bahcecioglu G, Basara G, Ellis B W, et al. Breast cancer models: Engineering the tumor microenvironment. *Acta Biomater*, 2020, 106: 1–21
- 5 Ridky T W, Chow J M, Wong D J, et al. Invasive three-dimensional organotypic neoplasia from multiple normal human epithelia. *Nat Med*, 2010, 16: 1450–1455
- 6 Carvalho M R, Lima D, Reis R L, et al. Anti-cancer drug validation: The contribution of tissue engineered models. *Stem Cell Rev Rep*, 2017, 13: 347–363
- 7 Carvalho M R, Lima D, Reis R L, et al. Evaluating biomaterial- and microfluidic-based 3D tumor models. *Trends Biotechnol*, 2015, 33: 667–678
- 8 Ovsianikov A, Khademhosseini A, Mironov V. The synergy of scaffold-based and scaffold-free tissue engineering strategies. *Trends Biotechnol*, 2018, 36: 348–357
- 9 Ho V H B, Guo W M, Huang C L, et al. Manipulating magnetic 3D spheroids in hanging drops for applications in tissue engineering and drug screening. *Adv Healthc Mater*, 2013, 2: 1430–1434
- 10 Li W, Liu X, Deng Z, et al. Tough bonding, on-demand debonding, and facile rebonding between hydrogels and diverse metal surfaces. *Adv Mater*, 2019, 31: 201904732
- 11 Song C, Gao D, Yuan T, et al. Microfluidic three-dimensional biomimetic tumor model for studying breast cancer cell migration and invasion in the presence of interstitial flow. *Chin Chem Lett*, 2019, 30: 1038–1042
- 12 Nashimoto Y, Okada R, Hanada S, et al. Vascularized cancer on a chip: The effect of perfusion on growth and drug delivery of tumor spheroid. *Biomaterials*, 2020, 229: 119547
- 13 Song Z, Cai S X, Chen S J, et al. A novel cancer invasion model based on a microfluidic device in a 3-dimensional matrix (in Chinese). *Chin Sci Bull (Chin Ver)*, 2012, 57: 2184–2191 [宋振, 蔡绍哲, 陈斯佳, 等. 基于微流控芯片构建三维基质支架中的肿瘤细胞侵袭模型. *科学通报*, 2012, 57: 2184–2191]
- 14 Shang M, Soon R H, Lim C T, et al. Microfluidic modelling of the tumor microenvironment for anti-cancer drug development. *Lab Chip*, 2019, 19: 369–386

- 15 Chung M, Ahn J, Son K, et al. Biomimetic model of tumor microenvironment on microfluidic platform. *Adv Healthc Mater*, 2017, 6: 1700196
- 16 Junttila M R, de Sauvage F J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, 2013, 501: 346–354
- 17 Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity*, 2013, 39: 782–795
- 18 Motz G T, Coukos G. The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression: Cancer and other tales. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11: 702–711
- 19 Ma C, Fan R, Ahmad H, et al. A clinical microchip for evaluation of single immune cells reveals high functional heterogeneity in phenotypically similar T cells. *Nat Med*, 2011, 17: 738–743
- 20 Nelson B H. CD20⁺ B cells: The other tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol*, 2010, 185: 4977–4982
- 21 Wang Y, Hu X, Kankala R K, et al. Endothelialized microrods for minimally invasive *in situ* neovascularization. *Biofabrication*, 2020, 12: 15
- 22 Ferrara N, Kerbel R S. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, 2005, 438: 967–974
- 23 Lin L, Lin X, Lin L, et al. Integrated microfluidic platform with multiple functions to probe tumor-endothelial cell interaction. *Anal Chem*, 2017, 89: 10037–10044
- 24 Lin L, Zheng Y, Wu Z, et al. A tumor microenvironment model coupled with a mass spectrometry system to probe the metabolism of drug-loaded nanoparticles. *Chem Commun*, 2019, 55: 10218–10221
- 25 Orimo A, Gupta P B, Sgroi D C, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 2005, 121: 335–348
- 26 Polanska U M, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts: Non-neoplastic tumour-promoting mesenchymal cells. *J Cell Physiol*, 2013, 228: 1651–1657
- 27 Thoma C R, Zimmermann M, Agarkova I, et al. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Adv Drug Deliver Rev*, 2014, 69–70: 29–41
- 28 Vasan N, Baselga J, Hyman D M. A view on drug resistance in cancer. *Nature*, 2019, 575: 299–309
- 29 Fridman I B, Ugolini G S, VanDelinder V, et al. High throughput microfluidic system with multiple oxygen levels for the study of hypoxia in tumor spheroids. *Biofabrication*, 2021, 13: 035037
- 30 Bergers G, Benjamin L E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 401–410
- 31 Ma W T, Wei T, Fu X F, et al. Quantitative engineering biology in the tumor microenvironment (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2021, 66: 319328 [马文涛, 魏婷, 傅雄飞, 等. 肿瘤微环境中的定量工程生物学. 科学通报, 2021, 66: 319328]
- 32 Roma-Rodriguez C, Mendes R, Baptista P V, et al. Targeting tumor microenvironment for cancer therapy. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 840
- 33 Chen F, Zhuang X, Lin L, et al. New horizons in tumor microenvironment biology: Challenges and opportunities. *BMC Med*, 2015, 13: 45
- 34 Najafi M, Goradel N H, Farhood B, et al. Tumor microenvironment: Interactions and therapy. *J Cell Physiol*, 2019, 234: 5700–5721
- 35 Wang X Y, Pei Y, Xie M, et al. An artificial blood vessel implanted three-dimensional microsystem for modeling transvascular migration of tumor cells. *Lab Chip*, 2015, 15: 1178–1187
- 36 Carvalho M R, Maia F R, Vieira S, et al. Tuning enzymatically crosslinked silk fibroin hydrogel properties for the development of a colorectal cancer extravasation 3D model on a chip. *Glob Chall*, 2018, 2: 1700100
- 37 Sun Y J, Hsu C H, Ling T Y, et al. The preparation of cell-containing microbubble scaffolds to mimic alveoli structure as a 3D drug-screening system for lung cancer. *Biofabrication*, 2020, 12: 025031
- 38 Barata D, Provaggi E, van Blitterswijk C, et al. Development of a microfluidic platform integrating high-resolution microstructured biomaterials to study cell-material interactions. *Lab Chip*, 2017, 17: 4134–4147
- 39 Yang X, Li K, Zhang X, et al. Nanofiber membrane supported lung-on-a-chip microdevice for anti-cancer drug testing. *Lab Chip*, 2018, 18: 486–495
- 40 Clark A M, Wheeler S E, Young C L, et al. A liver microphysiological system of tumor cell dormancy and inflammatory responsiveness is affected by scaffold properties. *Lab Chip*, 2017, 17: 156–168
- 41 Wang H, Liu H, Liu H, et al. One-step generation of core-shell gelatin methacrylate (GelMA) microgels using a droplet microfluidic system. *Adv Mater Technol*, 2019, 4: 1800632
- 42 Ng S, Tan W J, Pek M M X, et al. Mechanically and chemically defined hydrogel matrices for patient-derived colorectal tumor organoid culture. *Biomaterials*, 2019, 219: 119400
- 43 Fang Y, Eglen R M. Three-dimensional cell cultures in drug discovery and development. *SLAS Discov*, 2017, 22: 456–472
- 44 Xie R, Zheng W, Guan L, et al. Engineering of hydrogel materials with perfusable microchannels for building vascularized tissues. *Small*, 2020, 16: 1902838
- 45 Yu Y, Shang L, Guo J, et al. Design of capillary microfluidics for spinning cell-laden microfibers. *Nat Protoc*, 2018, 13: 2557–2579
- 46 Yao K, Li W, Li K, et al. Simple fabrication of multicomponent heterogeneous fibers for cell co-culture via microfluidic spinning. *Macromol Biosci*, 2020, 20: 1900395

- 47 Chen Q, Utech S, Chen D, et al. Controlled assembly of heterotypic cells in a core-shell scaffold: Organ in a droplet. *Lab Chip*, 2016, 16: 1346–1349
- 48 Zheng Y, Wu Z, Khan M, et al. Multifunctional regulation of 3D cell-laden microsphere culture on an integrated microfluidic device. *Anal Chem*, 2019, 91: 12283–12289
- 49 Liu Y, Huang Q, Wang J, et al. Microfluidic generation of egg-derived protein microcarriers for 3D cell culture and drug delivery. *Sci Bull*, 2017, 62: 1283–1290
- 50 Kankala R K, Zhao J, Liu C G, et al. Highly porous microcarriers for minimally invasive *in situ* skeletal muscle cell delivery. *Small*, 2019, 15: 1901397
- 51 Wang Y, Kankala R K, Zhang J, et al. Modeling endothelialized hepatic tumor microtissues for drug screening. *Adv Sci*, 2020, 7: 2002002
- 52 Shao C, Liu Y, Chi J, et al. Responsive inverse opal scaffolds with biomimetic enrichment capability for cell culture. *Research*, 2019, 2019: 9783793
- 53 Buchanan C F, Voigt E E, Szot C S, et al. Three-dimensional microfluidic collagen hydrogels for investigating flow-mediated tumor-endothelial signaling and vascular organization. *Tissue Eng Part C-Methods*, 2014, 20: 64–75
- 54 Cao X, Ashfaq R, Cheng F, et al. A tumor-on-a-chip system with bioprinted blood and lymphatic vessel pair. *Adv Funct Mater*, 2019, 29: 1807173
- 55 Ozkan A, Ghouseifam N, Hoopes P J, et al. *In vitro* vascularized liver and tumor tissue microenvironments on a chip for dynamic determination of nanoparticle transport and toxicity. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116: 1201–1219
- 56 Kim S, Lee H, Chung M, et al. Engineering of functional, perfusable 3D microvascular networks on a chip. *Lab Chip*, 2013, 13: 1489–1500
- 57 Wimalachandra D C, Li Y, Liu J, et al. Microfluidic-based immunomodulation of immune cells using upconversion nanoparticles in simulated blood vessel-tumor system. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 37513–37523
- 58 Zheng Y, Wu Z, Lin J M, et al. Imitation of drug metabolism in cell co-culture microcapsule model using a microfluidic chip platform coupled to mass spectrometry. *Chin Chem Lett*, 2020, 31: 451–454
- 59 Dereli-Korkut Z, Akaydin H D, Ahmed A H R, et al. Three dimensional microfluidic cell arrays for *ex vivo* drug screening with mimicked vascular flow. *Anal Chem*, 2014, 86: 2997–3004
- 60 Smith Q, Gerecht S. Going with the flow: Microfluidic platforms in vascular tissue engineering. *Curr Opin Chem Eng*, 2014, 3: 42–50
- 61 Lee H, Chung M, Jeon N L. Microvasculature: An essential component for organ-on-chip systems. *MRS Bull*, 2014, 39: 51–59
- 62 Riahi R, Yang Y L, Kim H, et al. A microfluidic model for organ-specific extravasation of circulating tumor cells. *Biomicrofluidics*, 2014, 8: 024103
- 63 Park Y C, Zhang C, Kim S, et al. Microvessels-on-a-chip to assess targeted ultrasound-assisted drug delivery. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 31541–31549
- 64 Miller C P, Tsuchida C, Zheng Y, et al. A 3D human renal cell carcinoma-on-a-chip for the study of tumor angiogenesis. *Neoplasia*, 2018, 20: 610–620
- 65 Buchanan C F, Verbridge S S, Vlachos P P, et al. Flow shear stress regulates endothelial barrier function and expression of angiogenic factors in a 3D microfluidic tumor vascular model. *Cell Adhes Migr*, 2014, 8: 517–524
- 66 Tang Y, Soroush F, Sheffield J B, et al. A biomimetic microfluidic tumor microenvironment platform mimicking the EPR effect for rapid screening of drug delivery systems. *Sci Rep*, 2017, 7: 9359
- 67 Danh T, Fiorelli R, Barrientos E S, et al. A three-dimensional (3D) organotypic microfluidic model for glioma stem cells-vascular interactions. *Biomaterials*, 2019, 198: 6377
- 68 Al-Abboodi A, Tjeung R, Doran P M, et al. *In situ* generation of tunable porosity gradients in hydrogel-based scaffolds for microfluidic cell culture. *Adv Healthc Mater*, 2014, 3: 1655–1670
- 69 Del Amo C, Borau C, Movilla N, et al. Quantifying 3D chemotaxis in microfluidic-based chips with step gradients of collagen hydrogel concentrations. *Integr Biol*, 2017, 9: 339–349
- 70 Dewhirst M W, Cao Y, Moeller B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8: 425–437
- 71 Yang Y, Sun M, Wang L, et al. HIFs, angiogenesis, and cancer. *J Cell Biochem*, 2013, 114: 967–974
- 72 Kaelin Jr W G. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8: 865–873
- 73 Bertout J A, Patel S A, Simon M C. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8: 967–975
- 74 Shweiki D, Itin A, Soffer D, et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 1992, 359: 843–845
- 75 Goldberg M A, Dunning S P, Bunn H F. Regulation of the erythropoietin gene: Evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science*, 1988, 242: 1412–1415
- 76 Hitchon C, Wong K, Ma G, et al. Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by

- synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 2002, 46: 2587–2597
- 77 Kourembanas S, Hannan R L, Faller D V. Oxygen tension regulates the expression of the platelet-derived growth factor-B chain gene in human endothelial cells. *J Clin Invest*, 1990, 86: 670674
- 78 Chang C W, Cheng Y J, Tu M, et al. A polydimethylsiloxane-polycarbonate hybrid microfluidic device capable of generating perpendicular chemical and oxygen gradients for cell culture studies. *Lab Chip*, 2014, 14: 3762–3772
- 79 Wang Z, Liu Z, Li L, et al. Investigation into the hypoxia-dependent cytotoxicity of anticancer drugs under oxygen gradient in a microfluidic device. *Microfluid Nanofluid*, 2015, 19: 1271–1279
- 80 Chittiboyina S, Rahimi R, Atrian F, et al. Gradient-on-a-chip with reactive oxygen species reveals thresholds in the nucleus response of cancer cells depending on the matrix environment. *ACS Biomater Sci Eng*, 2018, 4: 432–445
- 81 Bender B F, Aijian A P, Garrell R L. Digital microfluidics for spheroid-based invasion assays. *Lab Chip*, 2016, 16: 1505–1513
- 82 Ke L Y, Kuo Z K, Chen Y S, et al. Cancer immunotherapy mu-environment LabChip: Taking advantage of optoelectronic tweezers. *Lab Chip*, 2018, 18: 106114
- 83 Liu Y, Liu Y, Zheng X, et al. Recapitulating and deciphering tumor microenvironment by using 3D printed plastic brick-like microfluidic cell patterning. *Adv Healthc Mater*, 2020, 9: 1901713
- 84 Kim S, Chung M, Ahn J, et al. Interstitial flow regulates the angiogenic response and phenotype of endothelial cells in a 3D culture model. *Lab Chip*, 2016, 16: 4189–4199
- 85 Jain R K, Martin J D, Stylianopoulos T. The role of mechanical forces in tumor growth and therapy. *Annu Rev Biomed Eng*, 2014, 16: 321–346
- 86 Wlodkowic D, Cooper J M. Tumors on chips: Oncology meets microfluidics. *Curr Opin Chem Biol*, 2010, 14: 556–567
- 87 Wlodkowic D, Cooper J M. Microfabricated analytical systems for integrated cancer cytomics. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 398: 193–209
- 88 Dikici B A, Reilly G C, Claeysens F. Boosting the osteogenic and angiogenic performance of multiscale porous polycaprolactone scaffolds by *in vitro* generated extracellular matrix decoration. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12: 12510–12524
- 89 Xu Y, Gu Y, Cai F, et al. Metabolism balance regulation via antagonist-functionalized injectable microsphere for nucleus pulposus regeneration. *Adv Funct Mater*, 2020, 30: 2006333

Summary for “基于微流控技术构建3D肿瘤模型用于药物筛选”

Construction of 3D-tumor model for drug screening: Application of microfluidics

Sheng-Chang Luo^{1,2}, Ying Wang^{1,2}, Shi-Bin Wang^{1,2} & Ai-Zheng Chen^{1,2*}¹ Institute of Biomaterials and Tissue Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;² Fujian Provincial Key Laboratory of Biochemical Technology, College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China* Corresponding author, E-mail: azchen@hqu.edu.cn

Indeed, drug screening is employed for the purpose of scanning the efficacy of growth inhibitors or killing phenotype-oriented cells towards exploring the efficacy of chemotherapeutic agents. To explore this aspect of testing, various tools have been established, such as two-dimensional (2D) monolayer and three-dimensional (3D) culture models, which suffer from various limitations of time-consuming, failed to explore the PK-PD attributes in animals. To this end, various 3D tumor models have been fabricated to reproduce the corresponding drug sensitivity and resistance within the tumor aggregation *in vivo*, improving the accuracy of standard anticancer drug screening. Specifically, the 3D tumor model can be employed to mimic the dynamic reciprocity of the tumor microenvironment and overcome the shortcomings concerning genotype, phenotype, and so forth.

Furthermore, the biomaterials, namely scaffold-based 3D cancer models, have been designed with various properties to explore particular cues *in vivo*. The integrated TMEs possess cell-cell and cell-matrix interaction, which can be reproduced *in vitro* using different natural or synthetic materials. Cell-cell interactions are of great vitality for malignant tumors and can significantly affect the development of neoplastic cells. Endothelial cells in TMEs, where the hypoxia is given rise by close-grained structure, can be induced to facilitate angiogenesis. In addition, cancer-associated fibroblasts give rise to abnormal ECM content. Moreover, the tumorigenesis at the same time influences the physicochemical TMEs, where cell-matrix interaction incorporates gradient of the gas, stiffness around the cellular component. Together, the intricate TME allows the researchers to mimic target properties in virtue of the static 3D tumor model, although the carcinogenic effect or the progress of cancer locate a dynamic condition, which partly leads to drug screening inaccuracy.

Accordingly, the application of microfluidics, to a considerable extent, enhances the accuracy in fabricating 3D tumor models, which have gained enormous development in the field of tissue engineering and drug screening due to the excellent feasibility in simulating 3D tumor models. On the one hand, the microfluidic technology is characterized by laminar flow in the channel, where the stream of the fluid can be paralleled with default flow direction, and the only diffusion may be existed inside the passage, resulting in the controllable mass transfer. On the other hand, many blood vessels, as well as physical gradient, can be easily achieved. Additionally, the microfluidic chip is likewise emphasized by the ability of integration, which is employed to enrich the function.

Consequently, coupled with a scaffold-based 3D tumor model, the researchers have established various intensive models with respect to vascularization, migration, and metastasis of cancer. To further facilitate the superiority of this prospective field, with respect to perfusion and vascularization, coculture and gradient, as well as the advanced approaches to fabricate the scaffold in virtue of microfluidics, the developmental proposals are systemically discussed in this review. Firstly, the complicated composition of TMEs will be elaborated, and then put the eyesight on the development and prospective in scaffold-based tumor model on a chip.

microfluidics, tumor microenvironment, scaffold, drug screeningdoi: [10.1360/TB-2021-0245](https://doi.org/10.1360/TB-2021-0245)