

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.03.010

文章编号: 1005-8982 (2018) 01-0051-04

## 微流控技术在肿瘤血管生成中的应用进展

马晓洁<sup>1</sup>, 陈巧云<sup>2</sup>, 余曦冉<sup>2</sup>

(1. 川北医学院附属医院 肿瘤科, 四川 南充 637000; 2. 川北医学院 2013 级临床医学系, 四川 南充 637000)

**摘要:** 微流控芯片是一种新型技术, 以其在细胞培养、细胞微环境的模拟和控制、单细胞分析、理化控制以及精确图像采集等方面的独特的优势逐步引起关注, 该文对其在肿瘤血管生成方面的研究进行阐述, 希望能为今后相关研究的开展提供启发。

**关键词:** 微流控; 肿瘤; 血管生成

**中图分类号:** R730.2

**文献标识码:** A

## Progress report of Microfluidic technology in tumor angiogenesis

Xiao-jie Ma<sup>1</sup>, Qiao-yun Chen<sup>2</sup>, Xi-ran Yu<sup>2</sup>

(1. Department of oncology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 2. Department of clinical medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

**Abstract:** Microfluidic chip is a novel technology with unique advantages in cell culture, simulation and control of cell micro-environment, single cell analysis and precise image acquisition. This paper systemically reviewed role of microfluidic chip technology in tumor angiogenesis. This may provide inspiring hints for future investigation.

**Keywords:** microfluidic; tumor; angiogenesis

微流控芯片是一种新型的技术平台, 它利用不同的芯片材料构造出微米级的通道结构, 结合微流体控制技术, 能够相对精确地再现肿瘤微环境, 并能动态地观察血管生成过程中肿瘤微环境所发生的变化。以其独特的优势, 有逐渐取代传统的肿瘤血管生成体外模型的趋势。本文就微流控在肿瘤血管生成中的应用做一综述。

### 1 微流控技术

微流控技术是研究如何在微米和亚微米尺度下控制微小流体和颗粒的科学, 以分子分析、生化防御、分子生物学和机电系统技术为基础发展起来的 1 个新兴学科, 已在医学方面得到广泛的研究和应用。微

流控芯片 (microfluidics) 是微流控技术的具体实现形式, 是目前微全分析系统 (micro total analysis system,  $\mu$ -TAS) 中发展最为迅速和热门的领域。

不同的微流控芯片可以发挥不同的作用, 集成聚碳酸酯多孔膜的双层通道微芯片装置可以模拟细胞的相互作用, 而具有多层微通道结构的微流控芯片, 能筛选出最利于细胞生长的芯片通道条件<sup>[1]</sup>。微流控技术具有非接触、精确度高、组织培养、营养供应和废物清除功能等<sup>[2]</sup>优点, 而且其与传统的流体系统相比, 具有许多优势尤其是其强大的集成能力, 可使实验中的反应、前处理及检测等流程都能集成到 1 个微流控系统中完成。所以该项技术已在医学、生命科学等众多科学领域展示前所未有的发展潜力和应用价值。

## 2 肿瘤血管生成模型

肿瘤血管生成是指已存在的毛细血管网通过“萌芽”或“分叉”等方式生长出新的毛细血管的过程,其具体形成方式包括了出芽式血管生成<sup>[3]</sup>、血管生成拟态<sup>[4]</sup>、马赛克血管<sup>[5]</sup>、血管共选择<sup>[6]</sup>、募集内皮祖细胞<sup>[7]</sup>和淋巴管生成等<sup>[8]</sup>。

目前传统的肿瘤血管生成体外模型包括:①内皮细胞增殖实验模型:是在肿瘤血管生成中内皮细胞大多呈过表达状态为依据。检测细胞增殖常用方法:MTT法、SRB法、<sup>[3H]</sup>胸腺嘧啶核苷掺入法<sup>[9]</sup>。其缺点分别为:MTT法的实验结果受到细胞数量、MTT浓度、残留培养液的影响;SRB法只适用于贴壁细胞,而且操作过程繁琐,易造成人为误差;<sup>[3H]</sup>胸腺嘧啶核苷掺入法不仅要使用具有安全风险的放射性物质,而且需要通过细胞凋亡实验药物来评估药物对细胞增殖的影响,以排除药物毒性作用因素;②细胞迁移实验模型:包括创伤愈合模型和Boyden小室模型。这2种模型存在的缺点:创伤愈合模型,操作简便,但忽视划伤单层细胞后伤痕愈合过程中细胞增殖对实验结果的影响<sup>[10]</sup>。Boyden小室模型,操作技术要求高且人为因素影响较大,而计数方法不同也会造成统计结果误差较大<sup>[9]</sup>;③管腔形成模型:主要是考察内皮细胞在基质表面形成毛细血管网的能力<sup>[11]</sup>,该法不能实现对血管形成过程的实时动态的监测;④大鼠动脉环模型:是将包埋于纤维蛋白胶或胶原蛋白胶的大鼠动脉环在培养液中培养,观察血管出芽情况的方法<sup>[12]</sup>。但其缺乏正常的血液循环系统,使所处的血管环境脱离肿瘤微环境而导致其新生的血管的特性上与肿瘤微血管有差异。

肿瘤血管形成是1个非常复杂的过程,受多种因子的影响<sup>[13]</sup>。目前,传统的实验方法除其自身的缺点外,大多只是通过单因素、二维、甚至静态的方式进行研究,未能实现在3D条件下对血管生成过程进行动态的、多因子间的研究。而且传统的体外肿瘤血管生成模型仅仅针对肿瘤和血管的培养,而忽视对肿瘤微环境对血管生成的影响,缺乏肿瘤微环境的内皮细胞容易出现分子特征的变化,使得最终获得的实验结果与实际存在巨大的差距。为克服上述缺点,构建出更接近理想的肿瘤血管生成模型的体外模型成为一项艰巨的任务。

## 3 微流控在肿瘤血管生成中的应用

近年来,微流控芯片技术发展迅速,在生命科学

尤其是细胞研究领域得到广泛应用。微流控技术不光可以模拟肿瘤细胞生长微环境,为肿瘤微环境下的相关问题研究提供1个简便的研究平台,还可以给细胞提供一个立体的生长环境,实现对肿瘤微环境中细胞转移的各种关键参数进行动态调节<sup>[14]</sup>,实时动态观察细胞如何适应肿瘤微环境的变化<sup>[15]</sup>,并可以实现在可溶性生化因子的浓度梯度分布下肿瘤血管细胞生长的研究<sup>[16]</sup>。

### 3.1 微流控技术可以轻松解决对培养环境中流体压力的精确控制的难题

在肿瘤微环境内高渗性肿瘤血管提高间质流体压力并改变流动模式,该异常流体压力可以通过刺激肿瘤细胞和内皮细胞进而促进肿瘤血管生成推动肿瘤生长进程。BUCHANAN等<sup>[17]</sup>设计的一种体外肿瘤细胞与内皮细胞共培养的微流控系统,以探究不同流动剪切应力对肿瘤血管生成的影响,通过定量转录聚合酶链反应的分析下游分子,发现在管腔低流量条件下与内皮细胞共培养的肿瘤细胞增加促血管生成基因的表达。这凸显出微流控技术在评估内皮和肿瘤细胞对不同流动剪切应力条件下肿瘤血管生成反应的优势。

### 3.2 微流控技术可以再现肿瘤微环境

由肿瘤细胞、成纤维细胞、内皮细胞、免疫细胞和细胞外基质及其分泌的生长因子参与组成的肿瘤生长局部稳态环境,称为肿瘤微环境。目前研究发现,肿瘤血管的生成与微环境中各因素的变化着密切的关系<sup>[18]</sup>。微流控技术可模拟肿瘤微环境,研究其对肿瘤血管生成的影响。STROOCK等<sup>[19]</sup>构建一微流控平台,能够很好地实现对肿瘤微环境的再现,包括大部分由肿瘤细胞组成的混合细胞群及其周围的间质细胞和由内皮细胞内衬的血管,并通过仿生灌注免疫细胞来模拟其被运输和招募的过程。这实现对肿瘤微环境的近似模拟,使得构建出的模型更接近体内肿瘤微环境。

传统体外模型往往因其无法控制生化梯度和获取单细胞水平的图像而停滞不前。微流控技术下的体外模型可很好弥补这点缺憾。CHUNG等<sup>[20]</sup>制作一种新型微流控平台,在这个平台上通过访问图像来实现对生化和生物力学因素的采集,可以清楚地观察到Mtl3癌细胞系吸引的内皮细胞和诱导血管生成的过程,与此同时还能实现对内皮细胞与癌细胞共培养环境中的机械、生化因素的精确控制,来完成对肿瘤血管生成的影响因素进一步探讨。LEE等<sup>[21]</sup>提出有关于转移肿瘤产生微血管的微流控芯片,与其他模型相比其优点在

于肿瘤血管生成过程中癌组织与血管接口可实现精确成像,并对血管生成反应和肿瘤细胞的跨内皮迁移的定量分析。

### 3.3 微流控技术能实现对肿瘤血管的特性的模拟还原

肿瘤血管不同于正常组织血管,其特性表现为:①血管结构扭曲多变,管径大小不一;②血管壁薄而具有高度通透性;③血管血流紊乱,常静止不流动或倒流<sup>[2]</sup>。该肿瘤血管的特性在传统的体外血管生成模型常未被考虑,而微流控却能凭借自身优势实现对肿瘤血管的特性进行模拟还原。对此翟万银等<sup>[23]</sup>运用微加工技术,构建肿瘤血管微流控芯片。该芯片不仅能够控制微管道内液体的流动方向和速度,实现肿瘤血管内血液流向、流速的多变特点的模拟,并能节段性地调整微缝段管道的流向和流速模拟扭曲和粗细变化不均的肿瘤血管结构,还能通过促进内皮细胞迁移而使得血管出现稳定的泄漏点,实现对肿瘤血管高通透性的特点进行再现,这使得构建出的肿瘤血管更接近真实情况。

### 3.4 微流控技术可重建体内血管出芽形成过程

出芽式血管生成是肿瘤血管生成的主要方式。传统体外模型不能模拟出从内皮细胞到尖端细胞及柄细胞演变的动态过程,而微流控技术在细胞的定性、定量研究和增强成像以及内部生物控制能力上的优势,能够再现该过程。

NGUYEN等<sup>[24]</sup>构建一种三维出芽式血管生成的微流控模型,实时动态地观察到与体内出芽式血管生成标志结构一致的特征,由此表明该三维微流控模型能够很好重建体内血管出芽形成过程,有助于人们对该过程中所受影响因素展开研究。VERBRIDGE等<sup>[25]</sup>制作一种微流控模型,通过该仿生模型可观察在血管内皮生长因子的空间梯度变化下内皮细胞涂层血管的出芽情况,并能够实现微流控平台上生物和物理参数的调节。JEONG等<sup>[26]</sup>构建一微流控平台,通过其不仅能够精确控制内皮细胞的化学刺激,而且具备优良的光学分辨率和原位监测在化学梯度变化下的细胞形态的改变,这使得出芽式血管生成的整个动态演变过程能得到真实的反应。

### 3.5 微流控在肿瘤血管生成应用中存在的缺陷

微流控技术成功地用宏观尺度的方法来真实地模拟血管的生成、入侵及外渗,并取得可喜的成果。但即使是目前最先进的三维微血管灌注式模型仍然不具备趋化因子梯度定向诱导癌细胞趋化迁移的能

力,且新生血管网的几何结构也难以预测<sup>[27]</sup>。有研究者试图克服该问题,HYUNJAE等<sup>[28]</sup>人建立1个模型,能够实现清楚地成像和定量血管生成反应,具备介导癌细胞进入与微血管壁相邻的不同位置的能力,即肿瘤细胞跨内皮转移,同时模型能产生和维持生长因子和引诱剂的空间浓度梯度。然而,该模型仍然有缺陷,即血管出芽起源于没有细胞-细胞连接的内皮细胞簇,而不是先前存在的血管,这与体内病理状态下,肿瘤血管生成出芽起源于癌群附近完全血管有所差异。

所以综合起来微流控肿瘤-血管生成模型仍然存在一系列亟待解决的问题:①从微流控获得的结果与临床肿瘤组织间情况的关联性<sup>[29]</sup>;②对体内肿瘤微环境的还原度问题;③模型的稳定性和可重复性问题。针对该缺点,都需要进一步深入探索研究来使模型更加完善。

## 4 结论与展望

现今肿瘤血管生成体外模型不断地被人们应用于肿瘤血管的研究,随着人们对肿瘤血管的认识逐渐深入,多种的血管生成方式为人们所熟知。这也为肿瘤血管体外模型的构建提供更多的方向,而微流控技术凭借其各项优势为肿瘤血管生成体外模型的研究提供很好的研究前景,虽然目前还有一些需要大家继续探索解决的问题,但是整体上该技术的先进性有效性是毋庸置疑的,期待该技术在不久的将来大放异彩。

### 参考文献:

- [1] MONGERSUN A, SMEENK I, PRATX G, et al. Droplet microfluidic platform for the determination of single-cell lactate release[J]. *Anal. Chem*, 2016, 88(6): 3257-3263.
- [2] OZCELIKALE A, MOON H R, LINNES M, et al. In vitro microfluidic models of tumor microenvironment to screen transport of drugs and nanoparticles[J]. *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol*, 2017, 9(5): e1460.
- [3] WEI Z, WANG S, SHENG X, et al. Molecular regulation mechanism of tumor sprouting angiogenesis[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2013, 29(9): 1196-1204.
- [4] MANIOTIS A J, FOLBERG R, HESS A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry[J]. *Am J Pathol*, 1999, 155(3): 739-752.
- [5] CHANG Y S, DE TOMASO E, MC DONALD D M, et al. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(26): 14608-14613.
- [6] WESSELING P, RUITER D J, BURGER P C, et al. Quantitative immunohisto-logical analysis of the microvasculature in untreated

- hman glioblastoma multiforme. Computer-assisted image analysis of whole-tumor sections[J]. *Journal of Neurosurgery*, 1994, 81(6): 902-909.
- [7] LIU R, WANG H. endothelial progenitor cells and neovascularization of tumors[J]. *International Journal of Pathology and Clinical Medicine*, 2006, 26(4): 325-328.
- [8] WITTE M H, BERNAS M J, MARTIN C P, et al. Lymphangiogenesis and lymphangiodysp lasia: from molecular to clinical lymphology[J]. *Microsc Res Tech*, 2001, 55(2): 122-145.
- [9] XING Y, LIU G, CHEN H. Models of tumor angiogenesis assay[J]. *Letters in Biotechnology*, 2012, 23(3): 444-447.
- [10] LAMALICE L, LE BOEUF F, HUOT J. Endothelial cell migration during angiogenesis[J]. *Circ Res*, 2007, 100(6): 782-794.
- [11] XIE Z. A microfluidic-based model for investigation of tumor-induced angiogenesis[D]. Dalian: Dalian Medical University, 2013: 1-46.
- [12] ZHAO J, MIAO J, et al. Establishment of an in vitro model of tumor angiogenesis in vitro[J]. *China Biotechnology*, 2006, 26(3): 17-21.
- [13] NYBERG P, SALO T, KALLURI R, et al. Tumor microenvironment and angiogenesis[J]. *Front Biosci*, 2008, 1(13): 6537-6553.
- [14] STOCK K, et al. Capturing tumor complexity in vitro: comparative analysis of 2D and 3D tumor models for drug discovery[J]. *Sci Rep*, 2016(6): 28951.
- [15] AIJIAN A P, GARRELL R L. Digital microfluidics for automated hanging drop cell spheroid culture[J]. *J. Lab Autom*, 2015(20): 283-295.
- [16] PFISTERER L, KORFF T. Spheroid-based in vitro angiogenesis model[J]. *Methods Mol, Biol*, 2016(1430): 167-177.
- [17] 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[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2014, 20(1): 64-75.
- [18] CHOI Y, et al. A microengineered pathophysiological model of early-stage breast cancer[J]. *Lab. Chip*, 2015(15): 3350-3357.
- [19] STROOCK A D, FISCHBACH C. Microfluidic culture models of tumor angiogenesis[J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(7): 2143-2146.
- [20] CHUNG S, SUDO R, MACK P J, et al. Cell migration into scaffolds under co-culture conditions in a microfluidic platform[J]. *Lab Chip*, 2009, 9(2): 269-275.
- [21] LEE H, PARK W, RYU H, et al. A microfluidic platform for quantitative analysis of cancer angiogenesis and intravasation[J]. *Biomicrofluidics*, 2014, 8(5): 054102.
- [22] YANG J, CHEN Z. Advances in the study of angiogenesis and tumor growth[J]. *Journal of Zhejiang University*, 2001, 30(4): 190-192.
- [23] ZHAI W, WU L, JIA C, et al. A tumor capillary model preparation based on microfluidic chip for permeability assay[J]. *Journal of Functional Materials and Devices*, 2011, 17(5): 505-512.
- [24] NGUYEN D H, STAPLETON S C, YANG M T, et al. Biomimetic model to reconstitute angiogenic sprouting morphogenesis in vitro[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(17): 6712-6717.
- [25] VERBRIDGE S S, CHAKRABARTI A, DELNERO P, et al. Physicochemical regulation of endothelial sprouting in a 3D microfluidic angiogenesis model[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2013, 101(10): 2948-2956.
- [26] JEONG G S, HAN S, SHIN Y, et al. Sprouting angiogenesis under a chemical gradient regulated by interactions with an endothelial monolayer in a microfluidic platform[J]. *Anal Chem*, 2011, 83(22): 8454-8459.
- [27] KIM S I, LEE H, CHUNG M, et al. Engineering of functional, perfusable 3D microvascular networks on a chip, 2013, 13(8): 1489-500.
- [28] HYUNJAE L, WOOHYUN P, HYUNRYUL R, et al. A microfluidic platform for quantitative analysis of cancer angiogenesis and intravasation[J]. *Biomicrofluidics*, 2014, 8(5): 054102.
- [29] HSIEH-FU T, ALEN T, AMY Q, et al. Tumour-on-a-chip: microfluidic models of tumour morphology, growth and microenvironment[J]. *J R Soc Interface*, 2017, 14(131): 20170137.

(王荣兵 编辑)