

引文格式:

辛颖, 徐宝琪, 王军杰, 等. 用于高分辨率成像的肺器官芯片构建及肺炎模型应用研究 [J]. 集成技术, 2021, 10(4): 126-136.

Xin Y, Xu BQ, Wang JJ, et al. Construction of lung-on-a-chip for high-resolution imaging and application of pneumonia model [J]. Journal of Integration Technology, 2021, 10(4): 126-136.

用于高分辨率成像的肺器官芯片构建及肺炎模型应用研究

辛颖^{1#} 徐宝琪^{2#} 王军杰^{2#} 张荣荣^{1#} 温慧¹ 王金娟¹

梁帆¹ 金帆¹ 梁卓³ 黄建东^{1,4*} 黄术强^{1*}

¹(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳合成生物学创新研究院 中国科学院定量工程生物学重点实验室 广东省合成基因组学重点实验室 深圳 518055)

²(广东医科大学 东莞 523808)

³(香港大学理学院 统计及精算学系 香港 999077)

⁴(香港大学李嘉诚医学院 生物医学学院 香港 999077)

摘要 肺是人体呼吸系统的重要组成部分, 气道上皮是肺与外界接触的第一道屏障, 参与抵御外来的颗粒物、病原体等, 可将异物以痰的形式排出体外, 对维护呼吸道正常功能起到至关重要的作用。常用的体外细胞培养模型和哺乳动物模型尚不能完全模拟人体肺-气道微环境, 在人体细胞与病原体相互作用研究和药物研发应用方面具有一定的局限性。该研究设计制作了一种基于微流控技术的双通道肺器官芯片, 通过改进制备工艺使其能够满足高倍镜极短工作距离的要求, 用于高分辨率成像; 实现了模拟人体肺-气道微环境的气液界面气道上皮培养, 并且能够实时观察细胞与细菌的共培养过程, 为体外研究气道上皮和病原微生物的相互作用提供一个有力平台。

关键词 肺芯片; 微流控; 高分辨率成像; 铜绿假单胞菌; 肺炎模型

中图分类号 Q 811.2 **文献标志码** A **doi**:10.12146/j.issn.2095-3135.20210427007

收稿日期: 2021-04-27 修回日期: 2021-05-18

基金项目: 科技部重点研发项目(2020YFA0908803); 国家自然科学基金项目(31971350, 31800083, 31770111); 深圳市科技创新委员会项目(JCYJ20180302145817753, KQTD2015033117210153); 广东省合成基因组学重点实验室项目(2019B030301006)

作者简介: 辛颖(共同第一作者), 硕士, 研究方向为器官芯片; 徐宝琪(共同第一作者), 学士, 研究方向为器官芯片; 王军杰(共同第一作者), 学士, 研究方向为器官芯片; 张荣荣(共同第一作者), 博士, 研究方向为病原微生物的致病机制; 温慧, 助理研究员, 研究方向为器官芯片; 王金娟, 技术员, 研究方向为微流控单细胞技术; 梁帆, 技术员, 研究方向为数字微流控技术; 金帆, 研究员, 博士研究生导师, 研究方向为定量微生物学; 梁卓, 学士, 研究方向为医学图像分析与处理; 黄建东(通讯作者), 研究员, 博士研究生导师, 研究方向为合成生物学理论和应用研究, E-mail: jdhuang@hku.hk; 黄术强(通讯作者), 研究员, 博士研究生导师, 研究方向为微流控合成生物学, E-mail: shuqiang.huang@siat.ac.cn.

Construction of Lung-on-a-Chip for High-Resolution Imaging and Application of Pneumonia Model

XIN Ying^{1#} XU Baoqi^{2#} WANG Junjie^{2#} ZHANG Rongrong^{1#} WEN Hui¹
WANG Jinjuan¹ LIANG Fan¹ JIN Fan¹ LIANG Zhuo³
HUANG Jiandong^{1,4*} HUANG Shuqiang^{1*}

¹(Guangdong Provincial Key Laboratory of Synthetic Genomics, CAS Key Laboratory of Quantitative Engineering Biology, Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

²(Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

³(Department of Statistics and Actuarial Science, Faculty of Science, University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China)

⁴(School of Biomedical Sciences, Li Ka Shing Faculty of Medicine, University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China)

*Corresponding Author: jdhuang@hku.hk; shuqiang.huang@siat.ac.cn

#Equal Contribution

Abstract The lung is an important part of the human respiratory system, and the airway epithelium is the first barrier between the lung and the external. It is involved in defending against foreign particles, pathogens, etc, expelling foreign bodies as sputum and plays a vital role in maintaining the normal function of the respiratory tract. Commonly used *in vitro* cell culture models and mammalian models cannot fully simulate the human lung-airway microenvironment yet, and have limitations in the study of human cell-pathogen interactions and drug development. In this research, we designed a microfluidic chip by improving the preparation process to meet the requirements of very short working distance of high magnification microscope for high-resolution imaging. The lung-on-a-chip reproduced the air-liquid interface airway epithelial culture, simulated human lung-airway microenvironment and obtained real-time observation of the co-culture process of cells and bacteria. It provides a powerful research platform for studying the interaction between airway epithelium and pathogenic microorganisms *in vitro*.

Keywords lung chips; microfluidic; high resolution imaging; *Pseudomonas aeruginosa*; pneumonia model

Funding This work is supported by National Key R & D Program of China (2020YFA0908803), National Natural Science Foundation of China (31971350, 31800083, 31770111), Shenzhen Science Technology and Innovation Commission (KQTD2015033117210153, JCYJ20180302145817753), Guangdong Provincial Key Laboratory of Synthetic Genomics (2019B030301006)

1 引言

肺是人体与外界空气进行气体交换的重要器官,其基础结构由支气管反复分支形成的支气管树构成。支气管上皮作为肺的保护屏障,包含多种细胞类型,其中杯状细胞能够分泌黏蛋白,在上皮表面形成黏液性屏障,黏附流通进入支气管

的空气所包含的异物颗粒,同时溶解有毒气体。另一方面,支气管上皮的纤毛能够通过节律性的摆动将黏液及其上附着的粉尘、细菌等推向咽部,以痰的形式排出体外^[1-2]。

由于人体呼吸道直接与外部环境相通,肺易遭受大气污染物的刺激和破坏^[3],同时也容易受到病原微生物的侵袭^[4-5]。其中,细菌和病毒

所引起的肺部疾病最为常见,如肺炎球菌肺炎、铜绿假单胞菌肺炎等^[6]。目前耐药性细菌成为肺炎治疗急需解决的关键问题之一^[7],同时,有些病原体的致病机制也尚未明确,这给临床上肺部疾病的治疗带来了较大的挑战。在对致病菌的机制研究中,细菌的迁移、黏附和侵袭等运动机制的研究可以帮助理解复杂疾病的致病机理,但是由于细菌体积较小,故其运动机制的研究往往依赖于高分辨成像技术。其中,基于高分辨成像技术,能够更加直观且实时观测到细菌在人体细胞上发生的生理变化规律。对于肺部疾病致病机制和临床前药物开发的相关研究,目前常用的仍是体外细胞培养模型和哺乳动物模型^[8]。但常规的二维(2D)细胞培养难以反映体内复杂的组织器官功能特点,也无法反映人体组织器官对外界刺激产生的真实响应^[9]。哺乳动物模型可以提供一定的体内信息,但动物实验周期长、成本高,与人体存在较大的种属差异,因此对人体实际反应的预测能力较差^[10]。不仅如此,在体外细胞培养模型和哺乳动物模型中几乎无法对作用于其中的单个细菌进行分析观察和实时成像,同时对于细菌的观察也严重受限于目前常用的高分辨成像仪器的工作距离。人体器官芯片是近年来兴起的多学科交叉新技术,将微流控技术和细胞生物学进行结合,能够在微流控芯片上模拟人体器官的结构和微环境^[11-13],并已用于人类疾病发生和发展过程研究^[14-15]、临床药物研发^[16-17]以及体外生化诊断检测^[18]等。

在众多人体器官芯片中,肺芯片是最早被提出和开发的器官芯片之一^[19]。目前,肺芯片装置多具有双层通道,由聚二甲基硅氧烷(Polydimethylsiloxane, PDMS)制成的微孔膜隔开,通过在膜的上表面培养人体肺上皮细胞并覆盖空气来模拟气管,而在同一膜的对侧培养人血管内皮细胞并覆盖流动介质来模拟血管,重建肺泡-毛细血管界面,模拟肺部微环境^[20-21],可研

究肺芯片上细胞-细胞^[22]、细胞-基质^[23]、细胞-病原体^[24-26]等相互作用。在此基础上,一些肺部疾病模型也得以在肺芯片上构建,如慢性阻塞性肺疾病(Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD)^[27-28]、哮喘^[29]、肺炎^[30]、肺损伤^[31]、肺纤维化^[32]、肺癌^[33]等,这在肺部相关疾病的研究和实现个性化诊断及治疗上具有巨大的潜力。目前直观地反映和分析微流控肺芯片上人体细胞与细胞、细胞与病原体之间的相互作用需要借助高倍镜下的显微成像技术,而现有的肺芯片尺寸设计不能满足高倍镜低工作距离的要求,因此无法在高倍显微镜下对细菌清晰成像,限制了肺芯片上对细胞与细菌之间相互作用的研究。

本研究拟对现有的肺芯片制作工艺进行改良,构建一种可用于高分辨率成像的肺器官芯片,通过采用人支气管上皮样细胞(16HBE 细胞)重现肺部黏液屏障来模拟肺部微环境。同时,将 16HBE 细胞与铜绿假单胞菌进行共培养,构建一个简易的铜绿假单胞菌感染模型,直观观察细菌在细胞上的运动与定位,为人体肺组织与细菌的相互作用研究提供一个简便而有效的体外模型。

2 材料和方法

2.1 材料

聚二甲基硅氧烷(PDMS)单体与引发剂均购于美国 Dow Corning 公司;光刻胶 SU-8 2100 和 SU-8 3050 均购于美国 Microchem 公司;三氯(1H, 1H, 2H, 2H-全氟辛基)硅烷购于美国 Sigma-Aldrich 公司;空白菲林片购于深圳清溢光电股份有限公司;16HBE 细胞购于国家实验细胞资源共享平台;MEM(Minimum Essential Medium)培养基、胎牛血清和鼠尾 I 型胶原蛋白均购于美国 Gibco 公司;青链霉素混合液、0.25% 胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Saline,

PBS)均购于美国 Hyclone 公司; ZO-1 抗体购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司; DAPI 染色液购于江苏凯基生物技术股份有限公司; 阿利新蓝染色液购于北京索莱宝科技有限公司; 等离子清洗仪购于美国 Harrick Plasma 公司; 微量注射泵购于美国 Harvard Apparatus 公司; 激光共聚焦显微镜为日本尼康公司生产制造; CO₂ 细胞培养箱购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

2.2 用于高分辨率成像的肺器官芯片制作

(1) SU-8 模板设计与制作

上通道和下通道 SU-8 模板制作: 首先, 将硅片放进等离子清洗仪中档清洗 10 min。然后, 利用匀胶机将光刻胶 SU-8 2100 铺满制作上通道的硅片, 用 SU-8 3050 铺满制作下通道的硅片。其中, 上通道的匀胶转速为 1 300 r/min, 下通道的匀胶转速为 1 875 r/min, 二者匀胶时间均为 30 s。铺胶完成后, 将硅片置于热板上 95 °C 前烘 1 h。待硅片自然冷却至室温后, 用事先打印好的芯片掩膜覆盖于玻璃片 SU-8 胶层上, 置于紫外光刻机下曝光。曝光后立即将掩膜去掉, 将硅片置于热板上 95 °C 后烘 20 min。待硅片自然冷却至室温, 用显影液进行显影, 溶去未经曝光的 SU-8 光刻胶, 显影后用异丙醇清洗硅片模板, 并用压缩空气将其吹干。最后, 将模板放入烘箱内 180 °C 坚膜 30 min。

微柱阵列模板制作: 与上、下通道匀胶过程相似, 先使用 SU-8 3035 光刻胶, 匀胶速度为 2 500~2 750 r/min, 匀胶时间 30 s, 95 °C 前烘 20 min; 随后利用旋涂仪进行去边操作, 再前烘 10 min, 真空曝光, 95 °C 后烘 5 min; 最后, 进行显影和坚膜。

(2) 上通道 PDMS 制作

将 PDMS 单体与引发剂以质量比 10:1 混合均匀, 倒入上通道 SU-8 的模板上, 真空抽气除气泡, 在 80 °C 下烘 30 min, 固化后将 PDMS 从模板上剥离。

(3) 下通道 PDMS 及 PDMS 多孔膜制作

下通道及微柱阵列模板的硅烷化处理: 首先, 分别将装有下通道模板和微柱阵列模板的干净培养皿放入烘箱, 80 °C 干燥 30 min; 然后, 用等离子清洗仪处理干燥后的模板, 低档处理 10 min 后将其放入真空干燥器内, 将 20 μL 三氯(1H, 1H, 2H, 2H-全氟辛基)硅烷滴加到一片提前放置在真空干燥器内的干净载玻片上, 隔膜泵抽真空 10 min; 最后, 关闭隔膜泵, 关紧干燥器阀门, 静置 12 h 以上。

将 PDMS 单体和引发剂以质量比 10:1 混合均匀, 放入玻璃罐内抽真空除去气泡后浇筑在下通道模板和多孔膜模板表面。随后, 将微柱阵列模板转移到烘箱内的水平台上, 于模板上面放一片经等离子体高档处理 5 min 的菲林片, 并在其上放一块厚 1 cm 的 PDMS 块。紧接着在 PDMS 压块上表面放置一块厚玻璃, 且在玻璃上表面压上 1.5 kg 的砝码, 手动调节维持砝码、PDMS 压块及微柱阵列区域保持同一中心轴, 待 PDMS 压块不再滑动时即可。同时, 在下通道模板上覆盖相同处理的菲林片, 再于其上放置一块覆盖通道结构的磁铁, 下方放置另一块磁铁, 使两块磁铁平稳地吸附起来, 接着将整个装置放置于烘箱内。最后, 将下通道 PDMS 及多孔膜结构置于 60 °C 烘箱内固化 12 h。

待固化完成后, 移去砝码、磁铁、厚 PDMS 块及玻璃, 将菲林片与硅片模板分离, 此时下通道 PDMS 及 PDMS 多孔膜均黏附在菲林片上。

(4) 封接

首先, 将上通道 PDMS 与附在菲林片上的 PDMS 多孔膜进行等离子体封接, 于 80 °C 烘箱内烘 10 min 后, 用手术刀将封接体从菲林片上切割后揭下, 接着用打孔器在封接体上层通道 PDMS 的两个进样端及两个废液端打孔; 然后, 将厚度为 170 μm 的盖玻片与附在下通道 PDMS 的菲林片进行等离子体封接并放入 80 °C 烘箱内烘

10 min 后, 使用手术刀去除其上附着的菲林片; 最后, 将两次封接的产物进行等离子体封接, 放入 80 °C 烘箱内烘 10 min。

2.3 细胞培养

16HBE 细胞采用含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素混合液的 MEM 完全培养基培养, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱内进行培养。

肺芯片中的细胞培养: 芯片在使用前进行紫外消毒 2 h。用 MEM 基础培养基将 3.55 mg/mL 的鼠尾 I 型胶原蛋白稀释为 30 μg/mL 的胶原溶液, 将配制好的胶原溶液注入到芯片的通道内, 使其充满通道且无气泡产生, 随后放入 37 °C 培养箱内 2 h 进行表面胶原修饰。紧接着, 将软管与芯片连接, 设置微量注射泵流速为 30 μL/h, 过夜灌注完全培养基。用 0.25% 胰蛋白酶将 16HBE 消化下来, 再用 MEM 完全培养基将其重悬为单细胞悬液, 调整细胞密度为 10⁷ cell/mL 并接种于芯片通道内。待 16HBE 细胞在通道内沉降 2 h 后, 设置微量注射泵流速为 30 μL/h 培养 24~48 h。进行气-液界面 (Air-Liquid Interface, ALI) 培养时, 将上通道灌注的 MEM 完全培养基去除, 更换为湿润的空气, 以 30 μL/h 流速培养 24~48 h, 此时肺芯片中气-液界面形成。

2.4 细菌培养

实验所用的菌株由铜绿假单胞菌 (PAO1, ATCC 15692) 改造而来, 导入质粒 J23102-GFP-PUCP22 可得到表达绿色荧光的菌株。

将冻存的菌种从 -80 °C 冰箱取出置于冰上, 于超净工作台内使用无菌枪头蘸取菌种, 并在带有庆大霉素抗性的苛养厌氧菌琼脂 (Fastidious Anaerobe Agar, FAA) 平板上划线, 然后将其置于 37 °C 培养箱内过夜培养。第二日取出平板观察菌落生长情况, 挑取平板上生长旺盛且单独生长的单菌落, 接种于新鲜无菌的庆大霉素抗性的苛养厌氧菌肉汤 (Fastidious Anaerobe Broth, FAB) 培养基内, 200 r/min 摇菌培养 (培

养温度为 37 °C)。

肺芯片中的细菌培养: 在加入细菌前将已培养好 16HBE 细胞的肺芯片上、下通道使用的培养基更换为不带抗生素的 MEM 完全培养基。将处于对数期的细菌菌液在室温下以 5 000 r/min 离心 10 min。去除上清后, 使用 MEM 完全培养基将细菌重悬到光密度为 0.4。然后, 使用一次性 1 mL 无菌注射器吸取细菌悬液, 由上通道出口处注入芯片内。待细菌沉降 5 min 后, 设置注射泵流速为 30 μL/h 培养。在细菌与细胞共培养过程中, 将芯片置于激光共聚焦显微镜下观察细菌的定殖情况。

2.5 细胞表征

(1) 黏液: 将肺芯片从培养箱内取出并拆除外部管道, 用 PBS 冲洗通道 3 次, 再用 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min。接着用 PBS 清洗通道 3 次, 向通道内注入阿利新蓝酸化液 A, 室温孵育 3 min 后, 再向通道内注入阿利新蓝染色液 B, 室温避光孵育 30 min。最后用 PBS 冲洗通道内部残留的染液, 将芯片置于倒置相差显微镜下观察。

(2) 紧密连接: 将肺芯片从培养箱内取出并拆除外部管道, 先用 PBS 冲洗通道 3 次, 接着向通道内注入 4% 多聚甲醛固定 15 min。然后, 用 PBS 冲洗通道以除去多聚甲醛, 加入 0.2% Triton X-100 透化 10 min。再次使用 PBS 冲洗 3 次, 注入 5% BSA (Bovine Serum Albumin) 封闭 1 h。封闭后用 PBS 冲洗通道, 加入 1:100 稀释的 ZO-1 抗体 4 °C 孵育过夜。次日复温后, PBS 冲洗 3 次洗去抗体, 加入 DAPI 染色液孵育 5 min, 用 PBS 洗去染色液, 避光于激光共聚焦显微镜下观察。

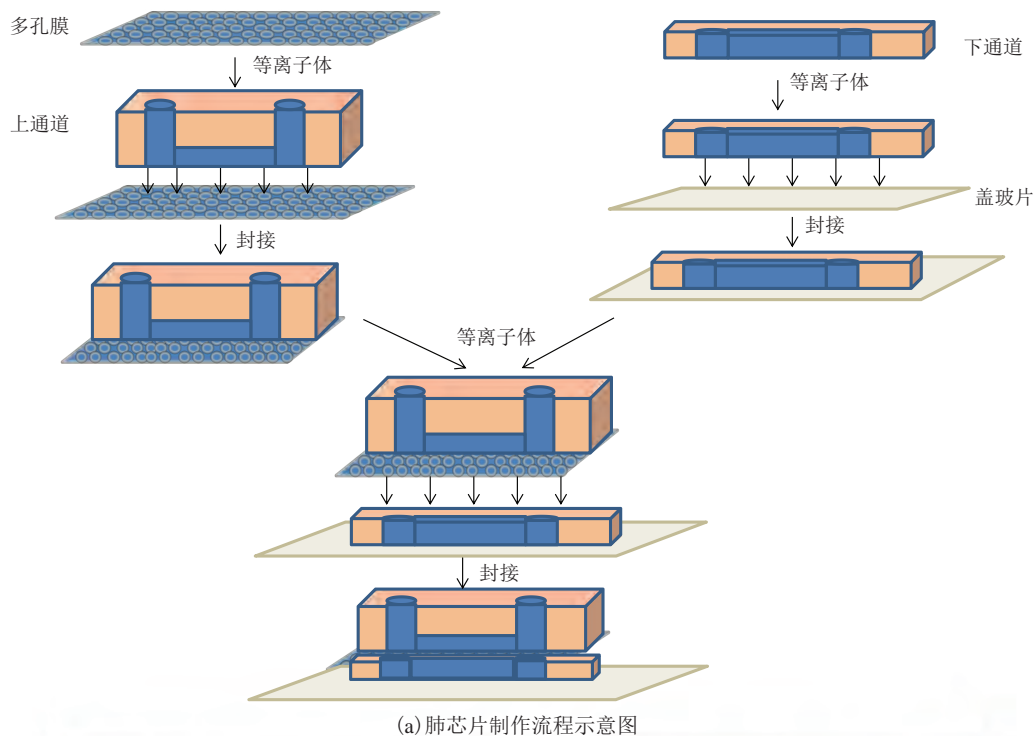
3 实验结果

3.1 用于高分辨率成像的肺器官芯片性能评价
为构建肺器官芯片, 本文采用 SU-8 光刻技术

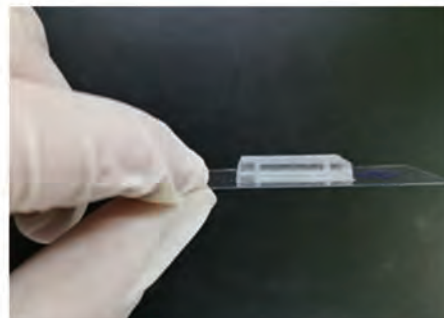
制作了由 PDMS 组成的微流体装置。PDMS 是一种具有较好理化性质和生物兼容性的有机聚合物材料, 其材质偏软且无毒, 适合细胞的培养。本文中的微流控肺芯片结构主要由上通道、多孔膜、下通道和盖玻片 4 个部分组成。其中, 芯片上微通道长 1 cm、宽 1 mm, 上层微通道高 125 μm , 类似于人类支气管的半径; 下层微通道高 55 μm , 上、下通道之间含有微柱阵列的多孔膜厚度为 32.5 μm , 细胞培养基可以通过灌注下通道给多孔膜上的细胞提供营养; 双通道的结构设计使芯

片能够形成气-液界面, 可模拟人体肺部气道微环境。肺芯片制作流程如图 1(a) 所示。

目前大多数研究中使用的双通道肺芯片在显微镜下观察时, 由于下通道结构太厚, 远远大于高倍物镜的低工作距离, 进而无法在高倍镜下观察细微的生物现象, 如细菌在细胞表面的黏附、迁移等。为解决肺芯片中细菌在高倍镜下的成像问题, 本文对以往的肺芯片制作工艺进行了改进——将下通道高度降低为 55 μm , 通道底部不再由 PDMS 封接, 而是由厚度为 170 μm 的盖玻



(b) 芯片实物俯视图



(c) 芯片实物侧视图

图 1 肺芯片

Fig. 1 Lung chip

片封接。这一设计工艺制作出来的肺芯片符合 60 倍油镜下成像的工作距离要求。肺芯片整体实物图如图 1(b~c)所示。

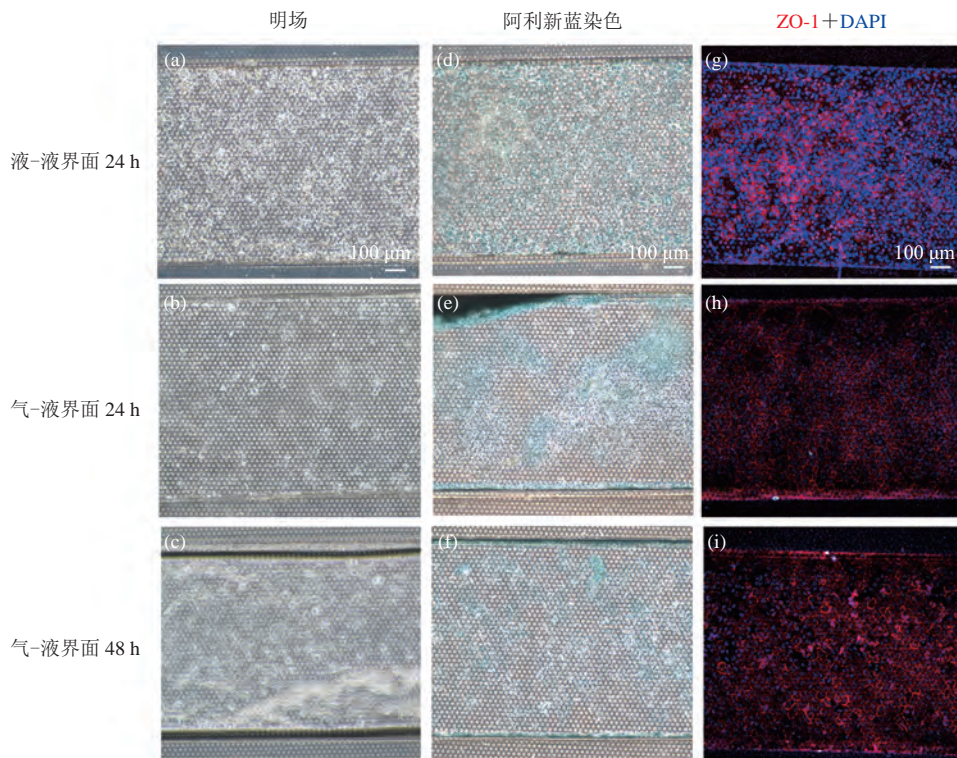
3.2 基于肺器官芯片的气道上皮模型构建

为了模拟人体肺支气管上皮, 本文采用 I 型鼠尾胶原对芯片内部进行修饰, 在芯片中注入源于正常人支气管上皮组织的人支气管上皮细胞——16HBE 细胞进行液-液界面培养。为了促进肺气道上皮细胞的分化、及更好地模拟肺部气道的微环境, 当 16HBE 细胞生长铺满整个多孔膜并融合为一个组织界面时, 将上层培养基去除, 引入湿润的空气以形成气-液界面。倒置相差显微镜观察结果显示, 16HBE 能够在肺芯片上正常生长, 并且当生长环境切换为气-液界面时, 16HBE 细胞未出现明显的细胞脱落, 保持与液-液界面细胞培养时相同细胞形态并且能够持续增殖。16HBE 细胞在液-液界面培养 24 h 后的生长

状态如图 2(a)所示, 在气-液界面培养 24 h、48 h 后的生长状态如图 2(b、c)所示。

3.3 支气管上皮功能表征

肺部黏液是肺组织的重要保护屏障。本文采用阿利新蓝染色法鉴定肺芯片上黏液的产生。倒置相差显微镜下观察发现, 肺芯片上气-液界面培养切换前后细胞黏液的分泌量无明显差异。如图 2(d~f)所示。紧密连接是构建细胞骨架的重要结构, 而紧密连接蛋白 ZO-1 是其重要组成蛋白之一。ZO-1 不仅能够调节上皮屏障功能, 还能维持上皮细胞极性。肺支气管上皮细胞通过含有 ZO-1 的紧密连接而连接在一起。为了验证肺芯片的生理功能, 本研究在肺芯片上培养肺支气管上皮细胞 16HBE, 然后对芯片上的细胞进行免疫荧光染色。在激光共聚焦显微镜下观察发现, 被红色染料标记的 ZO-1 沿细胞顶端表面的外缘均匀分布且边缘清晰, 被蓝色的 DAPI 染



注: 红色荧光代表 ZO-1 蛋白; 蓝色荧光代表 DAPI 染色的细胞核

图 2 肺芯片内 16HBE 细胞在不同培养条件下的功能表征图

Fig. 2 Functional characterization of 16HBE cells in the lung chip under different culture conditions

料标记的细胞核清晰可见, 并且转换为气-液界面培养的肺芯片与液-液界面培养条件下 16HBE 细胞紧密连接蛋白的表达未见明显差异, 如图 2(g~i) 所示。

肺芯片上 16HBE 细胞紧密连接蛋白 ZO-1 的表达和黏液的分泌表明, 本研究中构建的肺芯片具有肺支气管上皮细胞的功能, 能够用于后续实验研究中。

3.4 肺芯片上的细胞与细菌共培养及高分辨率成像

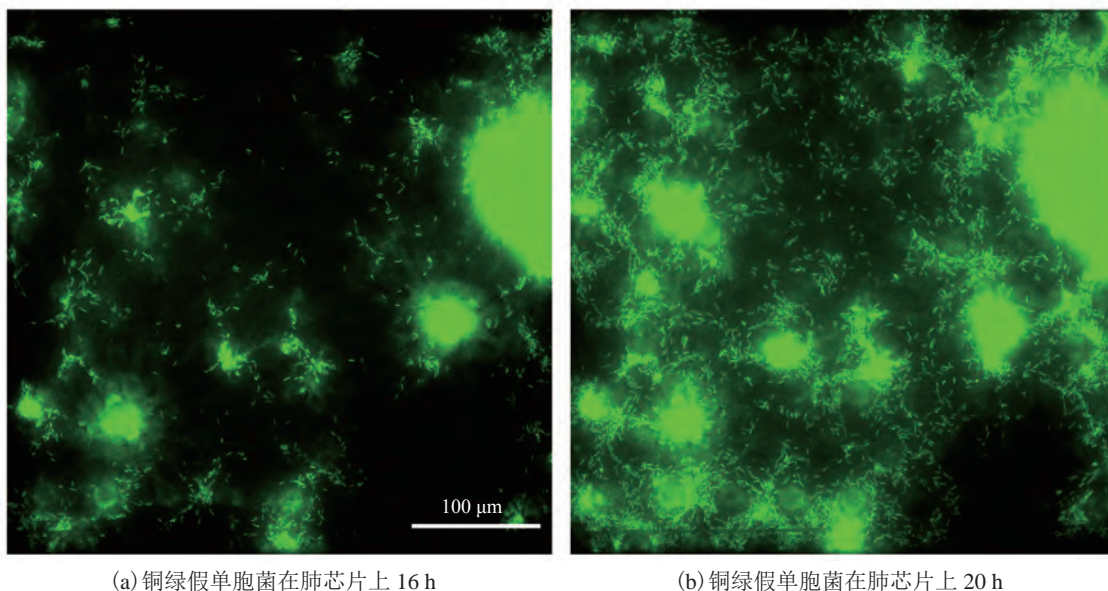
铜绿假单胞菌肺炎是近年来医院内感染最常见的肺部炎症之一。为了更直观地观察铜绿假单胞菌与人体细胞间的相互作用, 本研究将肺芯片改造为符合高成像分辨显微镜 60 倍油镜下成像工作距离要求的器官芯片。具体地, 将带有绿色荧光质粒的铜绿假单胞菌接种在构建好的肺上皮模型上, 于 60 倍油镜下实时观察铜绿假单胞菌在 16HBE 细胞上的定殖、迁移和黏附情况。细菌接种 5 min 后, 连通注射泵去除未沉降的细菌。如图 3 所示, 经过 20 h 的共培养后, 细菌仍黏附在细胞表面, 与 16 h 相比, 细菌绿色荧光的表达显著增多, 能够明显观察到细菌增殖并且主要

定殖在细胞与细胞之间的区域。即改造设计后的肺芯片能够清晰地观察到细菌在肺支气管上皮细胞上的定殖、迁移和黏附等。

为了进一步观察肺芯片上细菌与人体细胞的相互作用, 本文在铜绿假单胞菌与 16HBE 细胞共培养 14 h 后对肺支气管上皮细胞的紧密连接 ZO-1 进行了表征。如图 4 所示, 在细菌侵染后, 芯片内的细胞数量明显减少, 细胞的紧密连接蛋白 ZO-1 的表达明显降低。

4 讨论与分析

肺作为人体与外界环境进行气体交换的重要场所, 具有非常复杂的生理结构。构建一个能够准确反映肺部病理生理状态的体外模型尤为重要。本研究使用的肺芯片是一种基于微流控技术的器官芯片, 通过微流控装置在器官芯片上进行流体下的气-液界面培养来模拟肺部环境, 可以作为一个反映肺部病理生理的体外模型。有研究表明, 微流控器官芯片体系中持续流动的培养液能够给细胞施加生理水平的流体剪切应力^[34]。本

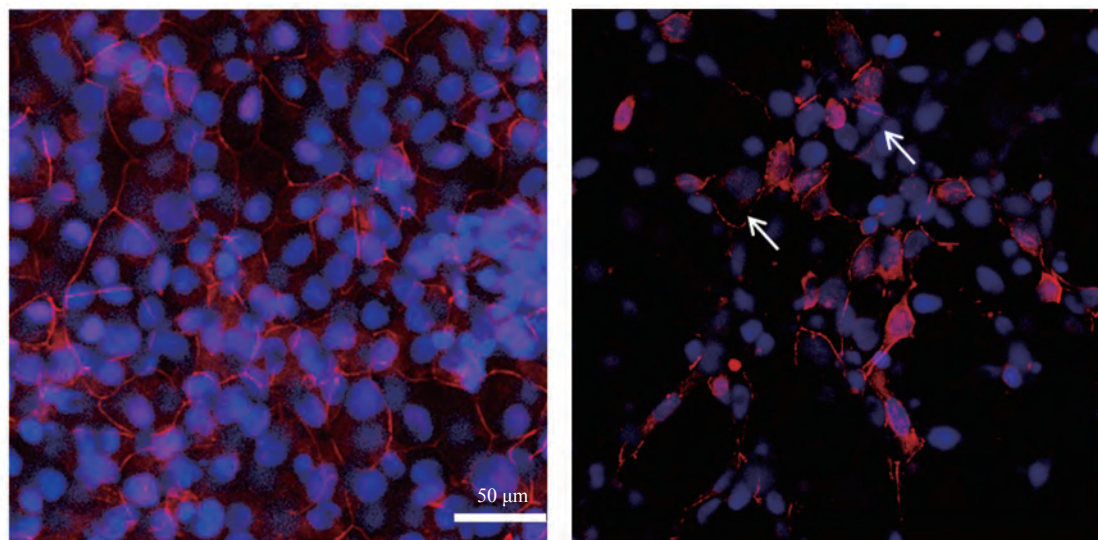


(a) 铜绿假单胞菌在肺芯片上 16 h

(b) 铜绿假单胞菌在肺芯片上 20 h

图 3 肺芯片上的铜绿假单胞菌

Fig. 3 *Pseudomonas aeruginosa* on a lung chip



(a) 肺芯片上未被铜绿假单胞菌侵袭的 16HBE

(b) 肺芯片上被铜绿假单胞菌侵袭 14 h 的 16HBE

注：白色箭头所指区域为紧密连接蛋白 ZO-1 缺失的区域

图 4 共培养后肺芯片免疫荧光染色图

Fig. 4 Immunofluorescence staining of lung microarrays after co-culture

文还通过芯片结构设计，使芯片上的通道结构类似于人体支气管的半径。另一方面，这种双通道的肺器官芯片的设计，能够使芯片上培养的细胞处于气-液界面培养环境，在一定时间内使细胞保持良好的生理状态和增殖活性，模拟了人体肺部气道微环境。同时，本研究还对肺芯片上构建的气道上皮功能进行了一定的验证：对肺芯片上培养的细胞的紧密连接进行免疫荧光染色后观察发现，气-液界面构建后紧密连接的表达无明显影响，表明体系上肺支气管上皮细胞不仅具有上皮屏障功能，还能够分泌黏液——具有肺部黏液屏障的功能，较好地重现了肺部微环境。

目前，一些肺部疾病已经在肺芯片上被成功构建，如慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 和哮喘。Benam 等^[27]设计了一种肺芯片以模拟肺支气管，通过构建 COPD 模型，及利用 COPD 患者的细胞在体外重建疾病的重要特征，研究了吸烟对 COPD 患者健康的影响，结果显示肺芯片在模拟肺部疾病、实现个体化诊疗方面具有巨大潜力^[28]。Punde 等^[30]建立仿生位系统模拟肺部微

环境，检测嗜酸性粒细胞阳离子蛋白 (ECP) 对肺部炎症的影响，发现 ECP 能够刺激 Beas-2B 细胞表达 CXCL 12，揭示了 CXCL 12-CXCR4 通路在肺炎中介导 ECP 诱导的纤维细胞外渗的作用。目前在肺芯片体系下进行病原体与人体肺细胞相互作用的研究相对来说还较少，其中一个比较重要的原因是目前已报道的肺芯片无法在高倍物镜下进行细菌与细胞相互作用的观察。肺疾病模型的成功建立不仅与细胞类型、流体流动条件、病原体与肺细胞或组织的相互作用等因素相关，还需用高分辨率显微镜成像技术对细胞和细菌相互作用的变化进行实时观察。本研究通过对肺芯片制作工艺的改进，以铜绿假单胞菌为例，在改进后的肺芯片上建立一个简易的铜绿假单胞菌肺炎模型，高倍油镜下对其进行实时观察发现，可看到单个细菌在细胞上的运动。同时，本文还通过紧密连接蛋白 ZO-1 的免疫荧光染色表征了铜绿假单胞菌对肺支气管上皮细胞 16HBE 细胞骨架的破坏作用。

需要说明的是，本文在肺芯片功能上的验证

还存在一些不足, 如对细胞在肺芯片上的活性没有进行定性和定量实验, 对细菌的生长特性也还没有进行系统性的分析。此外, 对肺芯片上铜绿假单胞菌与肺支气管上皮细胞的相互作用还需进一步探究。

5 小 结

本文描述了一种基于微流控技术的双通道肺器官芯片技术, 通过改造肺芯片的结构设计, 使其能够满足高倍油镜的工作距离, 实现高分辨率成像; 采用人体肺支气管上皮细胞 16HBE 模拟人体气道上皮组织, 通过气-液界面的切换在肺芯片上模拟人体呼吸系统的气道微环境, 验证了所构建的肺芯片具有人体气道上皮的细胞极性和细胞功能, 并在这一体系上实现了细菌与细胞的共培养以及相关生理现象的实时观察, 能够模拟肺部炎症疾病。本研究能够为体外研究细菌和细胞的相互作用提供一个便捷有力的工具。

参 考 文 献

- [1] Murray JF. The structure and function of the lung [J]. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 2010, 14(4): 391-396.
- [2] Boucher RC. Regulation of airway surface liquid volume by human airway epithelia [J]. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 2003, 445(4): 495-498.
- [3] Forbes LJL, Kapetanakis V, Rudnicka AR, et al. Chronic exposure to outdoor air pollution and lung function in adults [J]. Thorax, 2009, 64(8): 657-663.
- [4] Kube DM, Fletcher D, Davis PB. Relation of exaggerated cytokine responses of CF airway epithelial cells to PAO1 adherence [J]. Respiratory Research, 2005, 6(1): 69.
- [5] Rajan S, Cacalano G, Bryan R, et al. *Pseudomonas aeruginosa* induction of apoptosis in respiratory epithelial cells: analysis of the effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction and bacterial virulence factors [J]. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2000, 23(3): 304-312.
- [6] Shrestha J, Bazaz SR, Es HA, et al. Lung-on-a-chip: the future of respiratory disease models and pharmacological studies [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2020, 40(2): 213-230.
- [7] Sainz-Mejías M, Jurado-Martín I, McClean S. Understanding *Pseudomonas aeruginosa*-host interactions: the ongoing quest for an efficacious vaccine [J]. Cells, 2020, 9(12): 2617.
- [8] Hubatsch I, Ragnarsson EGE, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers [J]. Nature Protocols, 2007, 2(9): 2111-2119.
- [9] Patterson DM, Shohet JM, Kim ES. Preclinical models of pediatric solid tumors (neuroblastoma) and their use in drug discovery [J]. Current Protocols in Pharmacology, 2011, Chapter 14(1): Unit 14.17.
- [10] Zhang M, Xu C, Jiang L, et al. A 3D human lung-on-a-chip model for nanotoxicity testing [J]. Toxicology Research, 2018, 7(6): 1048-1060.
- [11] 向云青, 权菲菲, 温慧, 等. 基于仿生微流控技术的肠道器官芯片构建 [J]. 集成技术, 2020, 9(3): 56-65.
Xiang YQ, Quan FF, Wen H, et al. Construction of gut-on-a-chip based on bio-microfluidic technology [J]. Journal of Integration Technology, 2020, 9(3): 56-65.
- [12] Nikolic M, Sustersic T, Filipovic N. *In vitro* models and on-chip systems: biomaterial interaction studies with tissues generated using lung epithelial and liver metabolic cell lines [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2018, 6: 120.
- [13] Humayun M, Chow CW, Young EWK. Microfluidic lung airway-on-a-chip with arrayable suspended gels for studying epithelial and smooth muscle cell interactions [J]. Lab on a Chip, 2018, 18(9): 1298-1309.

- [14] Zhao Y, Kankala RK, Wang SB, et al. Multi-organs-on-chips: towards long-term biomedical investigations [J]. *Molecules*, 2019, 24(4): 675.
- [15] 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]. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2018, 103(2): 332-340.
- [16] Ghaemmaghami AM, Hancock MJ, Harrington H, et al. Biomimetic tissues on a chip for drug discovery [J]. *Drug Discovery Today*, 2012, 17(3-4): 173-181.
- [17] 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]. *Science Translational Medicine*, 2012, 4(159): 159ra147.
- [18] Feng DN, Lv JW, Abdulla A, et al. Simplified ARCHITECT microfluidic chip through a dual-flip strategy enables stable and versatile tumoroid formation combined with label-free quantitative proteomic analysis [J]. *Biofabrication*, 2021, 13(3): 035024.
- [19] Li KY, Yang XY, Xue C, et al. Biomimetic human lung-on-a-chip for modeling disease investigation [J]. *Biomicrofluidics*, 2019, 13(3): 031501.
- [20] Huh DD. A human breathing lung-on-a-chip [J]. *Annals of the American Thoracic Society*, 2015, 12(Suppl 1): S42-S44.
- [21] Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. From 3D cell culture to organs-on-chips [J]. *Trends in Cell Biology*, 2011, 21(12): 745-754.
- [22] El-Ali J, Sorger PK, Jensen KF. Cells on chips [J]. *Nature*, 2006, 442(7101): 403-411.
- [23] Huh D, Matthews BD, Mammoto A, et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip [J]. *Science*, 2010, 328(5986): 1662-1668.
- [24] Schicke E, Cseresnyés Z, Rennert K, et al. Staphylococcus aureus lung infection results in down-regulation of surfactant protein-mainly caused by pro-inflammatory macrophages [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(4): 577.
- [25] Thacker VV, Dhar N, Sharma K, et al. A lung-on-chip model of early *Mycobacterium tuberculosis* infection reveals an essential role for alveolar epithelial cells in controlling bacterial growth [J]. *eLife*, 2020, 9: e59961.
- [26] Zhang M, Wang P, Luo RH, et al. Biomimetic human disease model of SARS-CoV-2 induced lung injury and immune responses on organ chip system [J]. *Advanced Science*, 2020, 8(3): 2002928.
- [27] 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]. *Nature Methods*, 2016, 13(2): 151-157.
- [28] 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 Systems*, 2016, 3(5): 456-466.e4.
- [29] Nawroth JC, Lucchesi C, Cheng D, et al. A microengineered airway lung chip models key features of viral-induced exacerbation of asthma [J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2020, 63(5): 591-600.
- [30] Punde TH, Wu WH, Lien PC, et al. A biologically inspired lung-on-a-chip device for the study of protein-induced lung inflammation [J]. *Integrative Biology*, 2015, 7(2): 162-169.
- [31] Huh D, Fujioka H, Tung YC, et al. Acoustically detectable cellular-level lung injury induced by fluid mechanical stresses in microfluidic airway systems [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(48): 18886-18891.
- [32] Yang XY, Li KY, Zhang X, et al. Nanofiber membrane supported lung-on-a-chip microdevice for anti-cancer drug testing [J]. *Lab on a Chip*, 2018, 18(3): 486-495.
- [33] Asmani M, Velumani S, Li Y, et al. Fibrotic microtissue array to predict anti-fibrosis drug efficacy [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 2066.
- [34] Douville NJ, Zamankhan P, Tung YC, et al. Combination of fluid and solid mechanical stresses contribute to cell death and detachment in a microfluidic alveolar model [J]. *Lab on a Chip*, 2011, 11(4): 609-619.