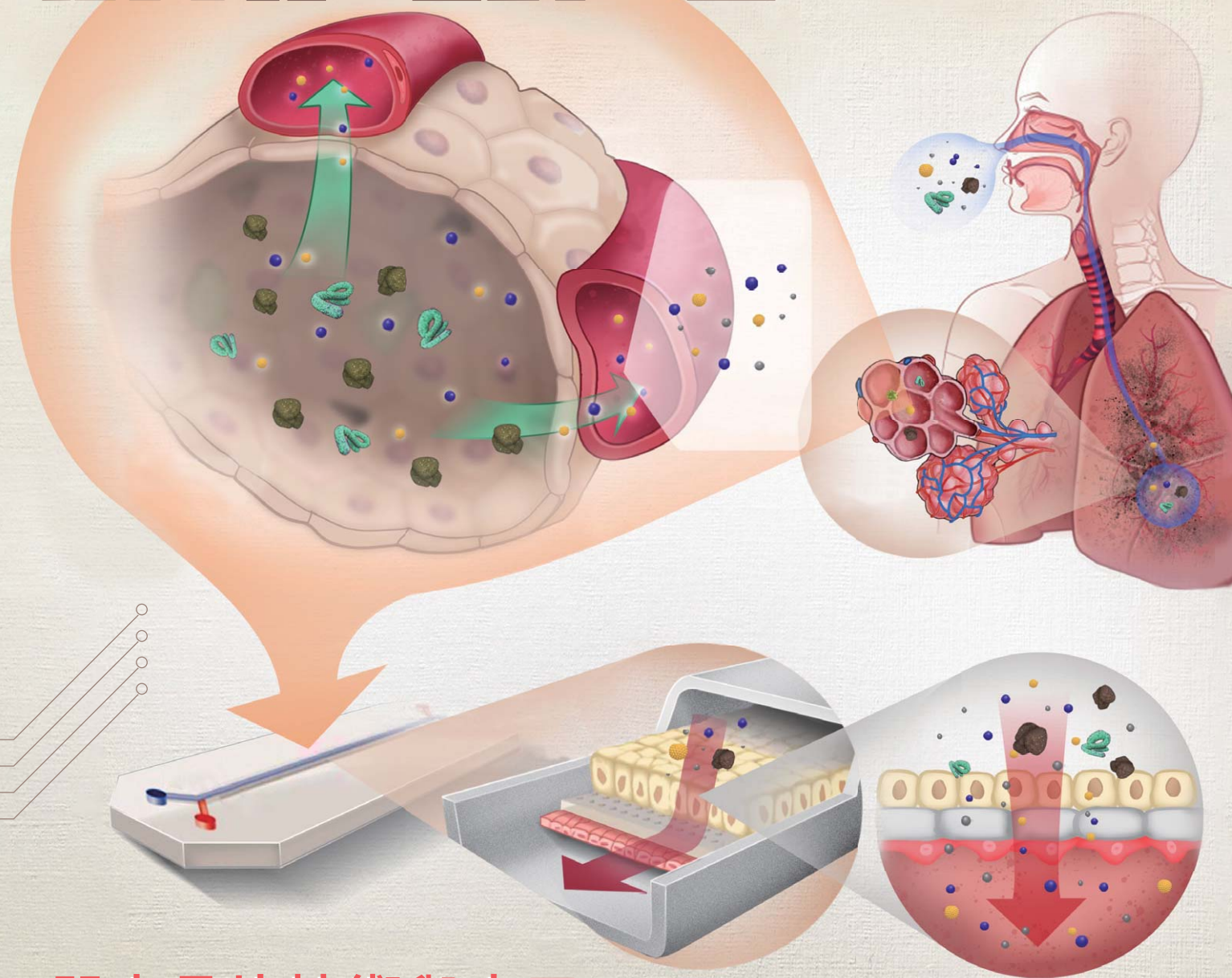


Instruments Today 2024 Q2

科儀新知



器官晶片技術與應用

Organ-on-a-chip Technology and Application

【人物專訪】

國立陽明交通大學 李鎮宜副校長

239

ISSN 1019-5440

Mitutoyo

以精密量測技術貢獻社會

NEW
Products



▲ 座標測定機

更多詳細資料



光學尺 ▶



NEW
Products



◀ 現場型
座標測定機

輪廓形狀 ▶
及表面
粗度測定機



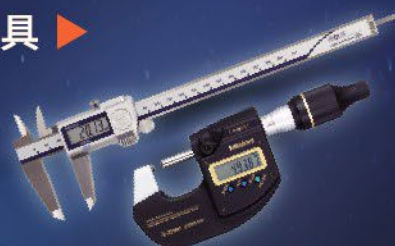
NEW
Products

NEW
Products



◀ 高精度CNC
影像測定機

測定工具 ▶



35th

傳承 創新 跨越

台灣三豐儀器
www.mitutoyo.com.tw

GMM

均華精密工業股份有限公司

Gallant Micro. Machining Co., Ltd.

(股票代號：6640)

2010

總部成立於土城工業區內

主要從事半導體相關生產設備及模具之研發、製造及銷售。
主力產品>>精密取放技術之晶粒挑揀機與黏晶機、精密加工技術之沖切成型機與自動封膠機、光電整合技術之雷射刻印機與光學檢測機等。

2018

正式掛牌上櫃(6640)

均華不斷致力新製程需求的設備研發，深受客戶肯定。開發先進的封裝設備關鍵技術，也結合國外關鍵模組廠商技術優勢，以優異的整合能力憑藉有限資源發揮最大研發成果，因而建立良好的獲利基礎。更因長年的技術積累，相關核心技術亦居於國內相關產業之領先地位。

半導體先進封裝、異質整合

主要商品/服務項目

半導體先進封裝精密取放設備設計、製造、銷售
自動雷射刻印機、自動沖切成型機設計、製造、銷售
精密模具及機械設備之設計、製造、銷售

歡迎各界菁英加入 共創產業未來

★完善的獎勵

年終獎金、員工分紅(視公司年度營運狀況、個人績效表現分發) / 三節禮金 / 生日禮金

★完善教育訓練

新進人員基礎訓練(師徒制) / 強化研發技術能量(內部教育訓練課程) / 個人潛能提升課程

★完整的保險福利

勞工保險 / 勞工退休金(新制) / 全民健康保險 / 公司團體保險(壽險、意外傷害險、意外醫療險、住院醫療險、癌症醫療險) / 員工及眷屬保險(提供優惠方案給予眷屬納保)

★休假

有薪病假3天 / 生理假 / 產檢假 / 陪產假

★職工福利

公司及福委會提供結婚禮金、生育禮金、喪葬補助金 / 員工家庭日 / 部門聚餐、歲末尾牙餐會 / 員工健康檢查 / 哺乳室 / 職工福利委員會特約廠商優惠 / 員工子女獎助學金 / 提供書刊及雜誌借閱 / 國內外旅遊

GMM

236 新北市土城區民生街2-1號
TEL : 02-2268-2216 FAX : 02-2268-0665

302 新竹縣竹北市台元一街8號7樓之9
TEL : 03-5601222 FAX : 03-5601292



高科技領導廠商

CONTROL

東捷科技



專注研發核心技術

自動化整廠規劃與製程設備

雷射應用設備

光學檢測設備

物流規劃與設備

真空製程設備

巨量轉移/巨量修補設備

以研發為主的設備製造商
專注於新型雷射應用與雷射微加工技術

擅長LCD製程設備整合整廠自動化

近年將技術應用擴展至 (micro) LED及半導體產業

為國內高科技領導廠商!

完善服務網絡，服務據點在地化
維修保養、定期設備調校、客戶問題即時對應！

WWW.CONTREL.COM.TW

☎ 06-5051188(台南總公司) 📍 服務據點:新竹.台中.台南.高雄

關注東捷





TRUSTED • TECHNICAL • SERVICE
Trusted electronic control partner

CNC控制器・自動化控制器・ 機械手臂・雲端 整合方案



ONE FOR ALL ALL IN SYNTEC

最值得信任的電控夥伴

新代科技股份有限公司
SYNTEC Technology Co., Ltd.

☎ 886-3-6663553
☎ 886-3-6663505

台灣新竹市東區研發二路25號

✉ sales@syntecclub.com.tw



SYNTEC



LEANTEC



LINE

HIWIN®

實現您的智慧工廠

HIWIN 為工業 4.0 提供高附加價值的整體解決方案
全方位系列產品，實現您的智慧工廠。



關節式機器手臂
Articulated Robot



史卡拉機器手臂
SCARA Robot



晶圓機器人
Wafer Robot



晶圓移載系統
EFEM



智慧型滾珠螺桿
Intelligent 4.0 Ballscrew
智慧型線性滑軌
Intelligent 4.0 Guideway



諧波減速機
DATORKER® Strain Wave Gear
旋轉致動器
DATORKER® Strain Wave Gear System



RCH系列



RCV系列



RAS系列

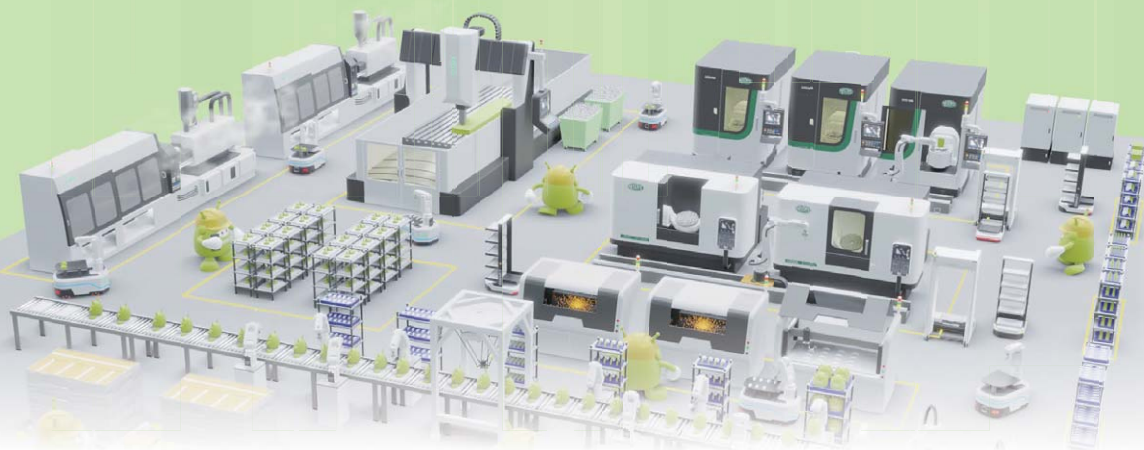


RAB系列

Torque Motor 迴轉工作台
Torque Motor Rotary Table



了解更多
HIWIN產品



全球營運總部

上銀科技股份有限公司
HIWIN TECHNOLOGIES CORP.
台中市40852精密機械園區精科路7號
Tel : (04) 2359-4510
www.hiwin.tw
business@hiwin.tw

關係企業

大銀微系統股份有限公司
HIWIN MIKROSYSTEM CORP.
台中市40852精密機械園區精科中路6號
Tel : (04) 2355-0110
www.hiwinmikro.tw
business@hiwinmikro.tw

全球銷售暨服務據點

德國 www.hiwin.de	日本 www.hiwin.co.jp	美國 www.hiwin.us	義大利 www.hiwin.it
瑞士 www.hiwin.ch	捷克 www.hiwin.cz	法國 www.hiwin.fr	新加坡 www.hiwin.sg
韓國 www.hiwin.kr	中國 www.hiwin.cn	以色列 www.mega-fabs.com	

TILTdot

無線傾斜儀

TILTdot 為一款具有 NB-IoT 無線傳輸功能之無線傾斜儀，同時提供雙軸向角度及溫度量測功能。

TILTdot 具有堅固的防水外箱及低耗電量的設計，使用2顆 18650 鋰電池可提供長時間量測記錄及資料上傳至 dot雲端網頁服務，其內建 32 GB Micro SD卡可備份儲存一佰萬筆以上資料。

- 大樓結構物傾斜監測
- 捷運、高鐵、橋梁等墩柱傾斜監測
- 捷運、高鐵等隧道結構傾斜監測
- 邊坡擋土牆傾斜監測
- 地表滑動監測



都市土木新建工程



河川水利工程



橋梁工程



邊坡安全

pALERT F330

一體化力平衡式地震儀

擁有高精度的三軸力平衡加速度計，擁有早期警報技術和先進功能，用於全面的地震防備。提供三種觸發邏輯 (Pd, PGA, STA/LTA) 和過濾選項，包括高通濾波器和低通濾波器，以減少非自然地震噪音。

- 地震預警系統(EEWS)
- 結構健康監測(SHM)
- 工業風險管理增強
- 生產線地震安全停機機制



住宅建築



工業基礎設施



製造廠



公共設施



應用奈米科技股份有限公司
APPLIED NANO TECHNOLOGY SCIENCE, INC.



公司專頁

我們矢志成為光電及半導體產業中，
真空設備核心技術提供者。

我們目標是整合高科技產業真空設備
元件，提供有信賴感的產品，登上全
球領導品牌。

磁流液軸封



特點

- 台灣設計/製造
- 高度密封性與高潔淨度
- 可依需求進行客製化設計
- 可提供維修服務
- [選配] 軸封洩漏檢知系統

接觸角影像分析儀



應用領域

- 生物相容性研究
- 奈米抗撥水表面驗證
- 玻璃基板潔淨度驗證
- 晶圓潔淨度管制
- HMDS製程管制
- 光阻與顯影製程開發
- BGA接合點潔淨度驗證
- 封裝接合面前處理



快速升溫/退火爐
(RTP/RTCVD)



AS-One 100



直接液體注入
(DLI)模組

VAPBOX 300

KEMSTREAM
ADVANCED VAPORIZERS

i-ONE 2024

國研盃儀器科技創新獎

NAR Labs Instrument Technology Innovation Competition

儀器競賽 - 提升儀器製作能力、促進儀器科技發展

儀器創意競賽

中學組 (含高職生)

首獎獎金新台幣 80,000 元
二獎獎金新台幣 40,000 元
三獎獎金新台幣 20,000 元
佳作獎金新台幣 8,000 元
入圍獎金新台幣 2,000 元

獲獎團隊指導老師頒發感謝狀與獎金 5,000 元

專上組 (含研究生)

首獎獎金新台幣 100,000 元
二獎獎金新台幣 50,000 元
三獎獎金新台幣 25,000 元
佳作獎金新台幣 10,000 元
入圍獎金新台幣 4,000 元

獲獎團隊指導老師頒發感謝狀

入圍決選者將頒發入圍證書與獎金，
另視參賽作品的創造性與特別性得增設特別獎

活動網址

<https://i-one.org.tw>



報名截止日期：2024 年 8 月 5 日

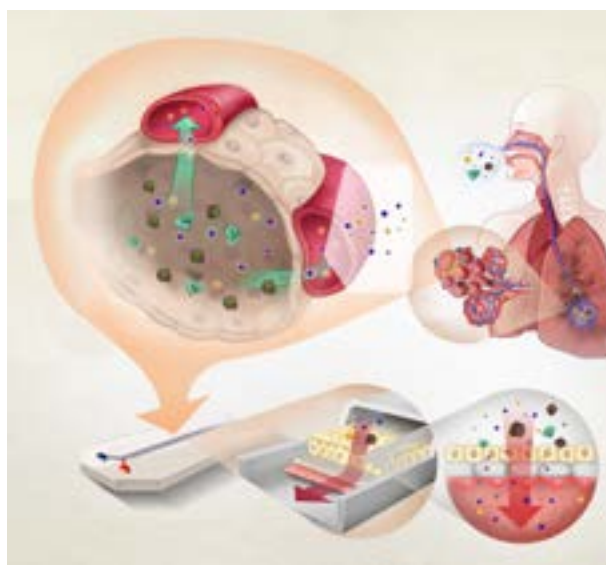
Tel：886-3-5779911 ext.304 林小姐

Email：i-one@narlabs.org.tw

科儀新知

INSTRUMENTS TODAY 季刊

中華民國 113 年 6 月 30 日出版



封面說明

封面為人體肺部中氣液介面 (air-liquid interface, ALI) 環境與肺晶片 (lung-on-a-chip, LoC) 之雙層結構對照示意圖。人體呼吸系統中特別是肺泡中的血液 - 氣體屏障扮演著關鍵角色，負責將氧氣從吸入的空氣中擴散到血液，同時排出二氧化碳。為模擬呼吸道微環境，國立陽明交通大學電機學院生醫工程研究所陳冠宇教授所領導的團隊在肺晶片中使用雙層通道和多孔性薄膜，透過分別在上層流道控制氣體流動，下層流道控制液體流動，並以多孔膜分隔實現體外模擬真實的呼吸道條件。(圖片為國立陽明交通大學電機學院生醫工程研究所陳冠宇教授所提供)

• 發行人：潘正堂

• 客座主編：曾繁根

• 執行編輯：林麗娥、陳柏荔、魏崇倫

• E-mail：tiri-editor@narlabs.org.tw

• 網址：http://www.tiri.narl.org.tw/Publication/InstTdy

• 地址：新竹市科學園區研發六路 20 號

中華民國 68 年元月創刊

• 電話：(03) 5779911 轉 304, 313

• 傳真：(03) 5789343

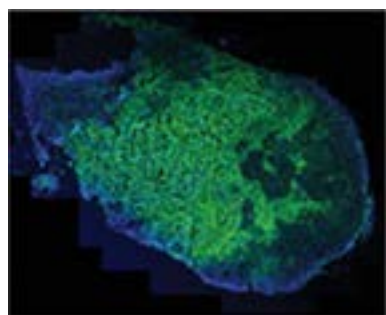
• 設計排版：宇豐廣告實業社

• 電話：(03) 5306633

國家實驗研究院台灣儀器科技研究中心出版



15



52

人物專訪

- 4 國立陽明交通大學－李鎮宜副校長
一個人走得快，一群人走得遠
林麗娥

器官晶片技術與應用

- 9 「器官晶片技術與應用」專題介紹
曾繁根

- 11 器官晶片技術之發展現況
黃念祖、熊彥程、王嘉珮

- 22 器官晶片技術與應用－以肺晶片為例
陳冠宇、石昂東、李珊宣

- 33 藥物與免疫反應篩選之腫瘤微環境晶片開發
胡尚秀、江銘仁、邱凱雯

- 42 癌症晶片用於新藥開發與用藥指引之潛力
林巧旻、黃振煌

- 54 腫瘤血管新生測試之三維細胞球共培養微流體晶片技術
羅明心、謝菲尼、許佳賢

- 64 用於藥物測試之灌流式三維細胞培養微流體晶片
吳旻憲

- 75 器官晶片結合介電泳技術應用於肝癌藥物篩選
趙梓茵、施采妤、王曉涵、孫偉倫、李岡遠、王克舜、劉承賢

- 84 整合壓電薄膜感測器之心臟器官晶片及其在藥物篩檢之應用
陳冠維、黃筠涵、楊秋鳳、許聿翔

INSTRUMENTS TODAY

June 2024

People

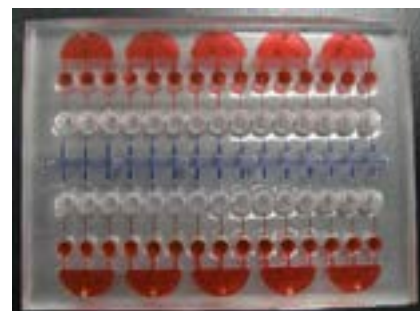
- 4** Dr. Chen-Yi Lee, Vice President of National Yang Ming Chiao Tung University
If You Want to Go Fast, Go Alone. If You Want to Go Far, Go Together.

Claire Lin

Special Issue: Organ-on-a-chip Technology and Application

- 9** Special Issue Introduction of "Organ-on-a-chip Technology and Application"

Fan-Gang Tseng



69

- 11** The Current Development of Organ-on-a-chip Technology

Nien-Tsu Huang, Yen-Cheng Hsiung, Chia-Pei Wang

- 22** Organ-on-a-chip Technology and Application–Taking Lung-on-a-chip as an Example

Guan-Yu Chen, Ang-Tung Shih, Shan-Hsuan Li

- 33** Tumor Microenvironments on a Chip for Drug and Immune-response Screening

Shang-Hsiu Hu, Min-Ren Chiang, Hoi Man Iao

- 42** Exploring the Potential of Cancer Chips in Novel Drug Development and Clinical Drug Guidance

Chiao-Min Lin, Jen-Huang Huang

- 54** A Microfluidic 3D Cell Spheroid Co-culture Technique for Tumor Angiogenesis Testing

Didem Rodoplu Solovchuk, Jefunnie Sierra Matahum, Chia-Hsien Hsu

- 64** Perfusion 3-D Cell Culture Microfluidic Chip for Drug Testing

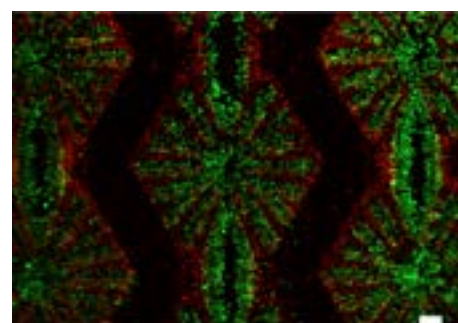
Min-Hsien Wu

- 75** Integration of Dielectrophoresis Technology with Organ-on-a-chip for Screening Liver Cancer Drug

Zih-yin Chao, Tsai-Yu Shih, Xiao-Han Wang, Wei-Lun Sun, Kang-Yun Lee, Ke-Shun Wang, Cheng-Hsien Liu

- 84** A Cardiac-chip Integrated with a Piezoelectric Thin-film Sensor and its Application of Drug Screening

Kuan-Wei Chen, Yun-Han Huang, Chiou-Fong Yang, Yu-Hsiang Hsu



82



國立陽明交通大學

李鎮宜 副校長

一個人走得快，一群人走得遠

If You Want to Go Fast, Go Alone. If You Want to Go Far, Go Together.

撰文：林麗娥

近年臺灣已積極尋找另一個「護國神山」或者組織「護國神山群」的新興科技，避免過於集中在半導體產業，而增加產業生態風險。在臺灣原有的半導體製造技術優勢基礎下，結合生物醫學發展「生醫晶片」，就具備極大的潛力成為臺灣的另一個國際亮點。《科儀新知》239期即以「器官晶片技術與應用」為主題，介紹這項新興技術與發展現況。本期「人物專訪」為讀者邀請到現任國立陽明交通大學電子研究所－李鎮宜副校長為大家現身說法，分享其20多年來由半導體跨足生醫領域的應用研究心得，研發成果包括無線智慧心電圖(ECG)感測晶片、智慧電刺激治療晶片以及可程式化實驗室晶片等等，近年更與諾貝爾醫學獎得主山中伸彌教授(Prof. Shinya Yamanaka)等人共同發展再生醫學，合作解決幹細胞製備關鍵技術等相關研究。

陽明交大的學生都知道，如果未來的就業方向是數位 IC (Integrated Circuit) 設計，由李鎮宜副校長在電子所開的招牌課程：積體電路設計實驗 (Integrated Circuit Design Laboratory) 非修不可，雖然一個學期的課業要求繁重，但卻讓學生收穫豐碩，所培育出來的學生更是一線 IC 公司首選的人才。副校長在求學上選擇到比利時攻取博、碩士，在研究上洞察先機，早在 2004 年就開始進行電資通訊與生醫領域的跨領域合作，一路雖選擇與別人走不一樣的路，也看到不一樣的風景。

比利時留學經驗

與當時多數人選擇到留學的美國或歐洲的英國、德國不一樣，副校長大學畢業後考取教育部公費留學資格至比利時荷語魯汶大學電機系攻取碩士及博士。1984 年 10 月來到比利時念書時，校園中僅不到十個來自臺灣的學生，到他畢業時已增加到七、八十位。就連監察院前副院長—孫大川教授都是他在魯汶大學的同學，副校長笑說：過年時他煮了一道「紅燒獅子頭」，跟孫大川教授一起扮演舞龍舞獅，他演龍頭我演龍尾，還被媒體報導出來。副校長也利用聖誕節連假到歐洲遊歷，先是搭渡輪到英國，接著買了歐洲鐵路全境通行證 (Eurail Global Pass) 旅遊歐洲各國，住在當地的青年旅館 (Youth Hotel) 與來自世界各地的年輕人一起互動。六年下來幾乎把整個歐洲都遊遍了。有些地方與現代詩人徐志摩所形容的一樣美麗浪漫，有些地方則是一片荒涼。總是「百聞不如一見，百見不如一聞」，趁年輕時多多體驗遊歷、開拓視野。

幸運的是，當時比利時政府為了發展微電子科技，就在副校長去比利時念書的第一年 (1984)，由 Prof. Roger Van Overstraeten 和他的指導教授 Hugo De Man 成立了跨校性的微電子研究中心 (今日的 imec)。讓當時原本專注於影像處理、物件辨別方面研究的副校長能有更佳的环境跨入硬體領域，有機會見證一個研究單位是如何從無到有、如何設定目標、爭取歐盟與比利時的經費支持，成為今日領導全球微電子發展及相關奈米技術研發的研究單位。在指導教授帶領下，更參與許多歐盟的大型計畫。就在副校長 1990 年要進行畢業學位口試時，創辦人 Van Overstraeten 教授還親切地關心他是不是要回臺灣教書，讓他留下深刻美好的印象。

投入生醫研究的初衷來自關照父母健康及做產業沒做的事

有遠見的副校長，因為看見利用半導體成熟的製程製作生醫晶片有望成為臺灣半導體領域新的出海口，所以早在國內還沒有很多人投入研究的時候，副校長就開始結合自己研究專業進行生物醫學的跨領域研究。而之所以有投入生醫領域這樣的想法契機，主要是因為他的學生畢業後多數投入聯發科 (MediaTek Inc.) 工作，在一次擔任科學管理局研發創新獎徵選競賽的評審活動，適逢自己指導過的學生參與競賽，除了看到自己學生優秀的表現之外，也發現業界設計的晶片，上面的電晶體可能就幾十億、幾百億顆，不管是製程還是投入晶片設計的複雜度，學校與業界所投入資源落差很大。

因此深刻體認到學校可以做出的研究，業界也可以做出來，但是業界也許會在評估商機後不投入量產，如此一來，學校所做的前沿研究就無法為社會解決問題、為業界培養創新的人才，因此希望可以帶領學生做一些產業沒有做的事情。再加上父母年紀漸長，無法時刻陪

伴在父母身側，若跨足到生醫領域可以開發行動健康照護相關系統，即時關照父母的健康情況。當時擔任中國醫藥大學附設醫院副院長陳瑞杰醫生，也建議副校長可以透過無線遠距長期收集生理訊號，幫助大眾進行生理健康的判斷。於是 2007－2011 年在經濟部計畫的支持下，與陳瑞杰醫生合作開發出無線即時心電圖監視系統。

由於半導體製作的生醫晶片所需時間和成本非常高，光是完成晶片驗證和雛型系統就需要將近一年以上的時間，其中光罩的成本更是高，必須要達到一定的量產規模，才能分攤成本，且晶圓廠考量研發難度、成本及時程，一般不會為生醫業者客製化調整製程參數。副校長表示，如何讓生醫晶片的研發不只是停留在學術界的研發，而且是未來可以進行的新興產業，現階段較為可行的方式還是要符合半導體製造的特性。舉例來說，在極微小的半導體元件尺寸中，就有很高的靈敏度，可以涵蓋小至細胞、分子層級的檢測。而且一片高階運算晶片就整合了數百億顆電晶體，有很強的運算能力和儲存容量，可以整合多種功能。再加上臺灣有完整的半導體生態系，透過晶片設計自動化軟體，可以強化生醫晶片的製造良率。

為了實現設計、順應市場變化進行更多領域的實際應用，副校長帶領團隊重新定位、更新整個生醫晶片的電路，研發上則維持幾個原則，首先使用標準製程，其次要讓生醫晶片可程式化，未來則不需要重新設計製作，僅需軟體更新，就可以應用在不同需求。尚若不遵照這些原則，很可能失去市場商機，就會像疫情期間，有些廠商因為快篩需求僅是在晶片上鍍膜 (coating) 去進行檢測，等到疫情結束、市場消失，容易造成公司庫存、同業削價競爭等狀況發生。

縮短工程與醫學的落差，帶領學生走出實驗室進行實測

副校長也分享了之前研發無線即時心電圖監視系統的過程，系統的訊號及診斷都很方便使用，為了推廣到偏鄉，學生很用心上山下海遠至南投、澎湖進行實測。副校長開玩笑說道：「學生一開始都興高采烈、很 high，但回來都滿失落的。原因在於學生的皮膚都很細嫩，所以在實驗室都很容易偵測到訊號，走出實驗室進行場域實測，才發現沒有這麼容易。」像是澎湖風吹日曬，皮膚相對比較粗糙，就比較不容易感測到訊號。但也是透過這樣的實測，才知道必須要有更精準的控制機制才可以取得訊號。老師也會帶領團隊把開發的裝置帶到醫院給醫生使用，因為與過去慣用的儀器操作不一樣，有時候面對醫生的質疑、不信任，學生回來有時候也嚷嚷跟副校長說：「以後不跟醫生合作了！」研究開發與創新包含一切從概念化到實現的一連串過程，惟有針對技術、產品的不斷鑽研，才能讓學生瞭解如何有效地研究開發，提升競爭力。副校長表示，透過這樣的過程才能真正獲取醫療院所的需求，縮短工程與醫學領域訓練與思考的落差，發揮 1 + 1 大於 2 的效應。

攜手諾貝爾醫學獎得主，製造質量幹細胞

副校長曾與台北榮民總醫院共同合作，將台積電技術製造的誘導性多功能幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPSC) 生醫檢測晶片，透過人工智慧篩選，提升視網膜移植技術的研究發展，加速黃斑部病變患者重見光明。副校長表示，會有這樣的技術開發與應用，最早要溯源到京都大學山中伸彌教授 (Prof. Shinya Yamanaka) 於 2006 年所開發的 iPSC 技

術，發現透過基因的重新編輯 (reprogramming)，從體細胞中成功製造出 iPSC，而幹細胞能分化成各種細胞成為修補身體組織的利器。爾後山中教授於 2010 年成立全球第一個研究 iPSC 先進技術的研究單位 CiRA (Center for iPS Cell Research Application)。iPSC 為再生醫學帶來突破性的影響及疾病治療的無限可能，這樣的重大發現，讓山中教授於 2012 年獲得諾貝爾醫學獎。2020 年 4 月成立 CiRA 基金會，iPSC 正式進入臨床實驗，並以促進細胞治療發展為目標。

如果可以從體細胞，藉由 iPSC 技術經過基因的重新編輯，產生幹細胞，成長到成為一個小組織，確認每一道流程都是準確、符合標準，就可以針對罕見疾病、黃斑部病變、脊髓損傷、帕金森症、癌症、糖尿病、各種器官衰竭等進行治療。而 iPSC 療法有四個重要影響因子 (factor)，當時山中伸彌並沒有申請專利，其他研究者也可以針對同樣的流程 (recipe) 去進行篩選，但如果過程稍不嚴謹，反而會產生腫瘤細胞 (tumor cell)。iPSC 療法過程十分嚴謹耗時，必須確認每一道程序都要符合標準，而且十分仰賴專家的知識技術，因此成本很高，當時整體治療成本一個人預估就要 4000 萬日幣以上，一年也只能治療 3 位左右的病患。為了降低成本、服務更多的病患，如何利用先進製程將生產流程自動化，製造出大量且高品質的幹細胞，成為急需解決的首要課題。

而 iPSC 治療過程與半導體上百道製程很接近，且臺灣具備紮實的半導體科技基礎，於是在國立陽明交通大學合校前交通大學張懋中前校長、陽明大學郭旭崧前校長、宏碁創辦人施振榮先生、京都大學陳玠甫客座教授等人的積極推動下，於 2020 年 5 月，京都大學 CiRA 基金會與陽明交大雙方簽訂合作備忘錄。雖因新冠疫情影響擴大，雙方交流一度趨緩，2022 年初又重啟拜訪，共同研發 iPSC 的次世代自動化 3D 製備技術，並將符合國際標準 PIC/S GMP 的細胞工廠規範引入臺灣，有助於提升臺灣透過 CDMO (委託開發製造服務) 的方式，站穩在量產製備幹細胞的實力。

2022 年上半年日方派遣研發人員進駐陽明交大，跨領域整合生物醫學研究多時的副校長所開發出的生醫晶片，正可以實際應用在偵測幹細胞的製備品質。副校長表示，團隊製作的 iPSC 生醫晶片採用國內晶圓廠的標準半導體製程完成設計、製作與量測平台的建置，提供微流道運算 (切割、混合、移動等不同尺寸樣本的需求)、介電泳、二維／三維電容感測、溫度控制等功能，滿足生物實驗室的作業流程，同時透過標準作業流程 (bio-protocol) 進行自動化的細胞檢測。日方研究成果透過臺灣半導體技術的加值應用，未來還能夠做到精準醫療、甚至藥物開發，整體效益將會相當可觀，為臺灣半導體開拓更多發揮空間，預計於 2025 年大阪世界博覽會進行成果展示。

副校長也表示，該技術採以非破壞性的方式來檢測 iPSC，日方希望未來在檢測過程中，能將好的細胞留下來，殺掉不好的細胞，避免好的細胞受到影響。就好比英國的林肯郡野生動物園，在 2020 年 8 月收容了 5 隻非洲灰鸚鵡，沒想到當他們開始外出見遊客不久之後，一個個開始學會了髒話，後來罵髒話的習慣又感染了另外 3 隻鸚鵡。這些聰明的小鸚鵡，很可能是無意間學習了遊客罵髒話，隨後進行模仿，卻發現人們對此感到吃驚，還會開懷大笑，便激起了他們的表演慾望，即便髒話鸚鵡小隊爆紅，動物園方仍開始想辦法要讓髒話鸚鵡小隊回到正常型態，將這 8 隻鸚鵡，轉移到另一個有著 100 隻不說髒話的鸚鵡籠中，希望能產生「教化薰陶」的效果。在動物的世界是這樣，細胞的世界也是這樣，所以希望可以透過生醫晶片進行篩選，將發現有不好細胞的區域，透過加熱，消除不好的細胞。

創業維艱，仍需創新

臺灣是一個中小型國家，無論是市場大小及人才數目，對於經營獨角獸等級的新創企業來說都相對不易。副校長為多個新創公司的共同創辦人，其表示儘管臺灣教育方式、社會環境氛圍，都相對不鼓勵新創。然而，新創產業為社會帶來活力，為年輕人帶來創業希望，以臺灣規模來說，或許不一定要人人都去創業、不用追求獨角獸，但可以追求規模較小的迷你獨角獸，只要有幾個甚至數十個獨角獸新創企業，仍然可以在臺灣這種中型市場上市，透過公開募資的手段成長茁壯，並與傳統的 ICT 業者共構、共創、共享產業成果。因此還是要鼓勵新創，以創造屬於臺灣獨特有的影響力。

運動抗壓提升研究能力

在陽明交大經常可以看到副校長在校園裡運動慢跑，除了自身養成運動的好習慣，還是全校最支持學生運動的副校長，很多校園的賽事像是排球、籃球等比賽都可以看到副校長親自出席坐鎮為場上的學生加油打氣。副校長分享表示，運動對他來說是一個紓解壓力的方式，常常研究做到瓶頸或是工作煩悶的時候，只要去運動讓自己抽離一下高壓的環境，或者邊跑步邊思考，有時候瞬間靈光乍現想到解決的方式。而且運動有助睡眠，提高教書、作研究的效率，如此就會形成一個正向的循環。研究的路很長，需要有健康的身體去面對。

副校長唸書時就是學校的足球校隊，運動除了有益身心健康，也讓他從中培養許多領導技能，像是溝通、試錯的勇氣、遵守紀律、設定目標策略等。從事體育運動的人學習如何向他人展示他們的獲勝想法、也培養傾聽他人的意見，都有助於未來在業務上取得成功。加上與同學一起練球訓練的情誼，也豐富了學生生活、創造美好回憶。

給儀科中心 50 歲的生日祝福

儀科中心是國研院最早成立的實驗室，協助國內培育許多優秀的人才。從精密儀器 (Device) 的角度來看，儀器是跨領域的科學必須結合軟硬體才能運作，惟有團隊彼此持續合作、成員依照各自具備的技能，才能合力完成儀器設備的組裝並提供服務。因此，副校長以出自交大前校長張懋中院士的著作書名《同行致遠》來祝福即將邁入 50 周年的儀科中心。「一個人走得快，一群人走得遠」，祝福儀科中心同仁要抱持「同行致遠」的合作精神，持續穩健前進。

「器官晶片技術與應用」專題介紹

Special Issue Introduction of "Organ-on-a-chip Technology and Application"

客座主編－曾繁根教授

國立清華大學工程與系統科學系特聘教授

由於器官晶片能用來模擬像是心臟、肝臟、肺臟等人體器官的結構和功能，因此有助於疾病研究、新藥開發和精準醫療的發展，並有助於「動物替代實驗」的推動。緣此，本期特別推出「器官晶片技術與應用」專題，介紹這項新興技術的發展現況與應用。配合專題本期「人物專訪」為讀者邀請到現任國立陽明交通大學電子研究所－李鎮宜副校長為大家現身說法，分享其由半導體跨足研發生醫晶片 20 多年的應用研究心得。

本期首先收錄之文章為國立臺灣大學電機系及生醫電子與資訊學研究所黃念祖教授：「器官晶片技術之發展現況」介紹器官晶片系統的主要組成元件，並探討器官晶片目前的挑戰及未來的發展方向。國立陽明交通大學生醫工程研究所陳冠宇教授：「器官晶片技術與應用－以肺晶片為例」除了補充器官晶片的研發背景、核心技術之外，輔以肺晶片為例說明相關應用實例。為了實現精準模擬腫瘤微環境，國立清華大學生醫工程與環境科學系胡尚秀教授：「藥物與免疫反應篩選之腫瘤微環境晶片開發」先針對腫瘤微環境晶片做了詳實的介紹，國立清華大學化學工程學系黃振煌副教授則是進一步說明團隊所開發出的腫瘤微環境晶片，能重建腫瘤組織中的複雜特性，包括氧氣梯度、細胞異質性以及化合分子和細胞的動態循環。國家衛生研究院生醫工程與奈米醫學許佳賢研究員：「腫瘤血管新生測試之三維細胞球共培養微流體晶片技術」，其團隊建立了懸吊液滴新型微流體三維細胞球共培養裝置，以簡化細胞培養操作並提高球體共培養實驗的成功率。在藥物篩選和研發、疾病模型的建立上，長庚大學生物醫學工程系吳旻憲特聘教授：「用於藥物測試之灌流式三維細胞培養微流體晶片」則著重於灌流式三維細胞培養微流體晶片的介紹，成為提供穩定、均一、仿生、高通量化、低實驗資源需求及操作方便的高效率細胞培養工具。國立清華大學動力機械工程學系劉承賢教授：「器官晶片結合介電泳技術應用於肝癌藥物篩選」帶領團隊成功建置模擬肝小葉的器官晶片，模擬人體內腫瘤微環境，並作為手術後的藥物選擇依據。國立臺灣大學應用力學所許聿翔副教授：「整合壓電薄膜感測器之心臟器官晶片及其在藥物篩檢之應用」則是介紹團隊所開發的心臟壓電耦合系統，可促進心肌組織在七天左右的培養時間內達到足夠成熟且同步之心肌組織，並可進行藥物功能性篩檢的實驗。

儘管目前歐美器官晶片發展領先於臺灣，然而臺灣仍有機會在原有的半導體製造技術優勢及 ICT 基礎下，從標準化製程、人工智慧與系統整合之下，在國際器官晶片佈局中佔有一席之地。期望在本期作者群深入淺出的介紹下，激發讀者新的研究想法與方向，為醫療科學發展帶來更大的潛力。

器官晶片技術之發展現況

The Current Development of Organ-on-a-chip Technology

黃念祖、熊彥程、王嘉珮

Nien-Tsu Huang, Yen-Cheng Hsiung, Chia-Pei Wang

器官晶片是一種新穎的體外平台用於類器官的培養，主要架構由實驗室晶片所衍生，其中關鍵元件如微流道、微感測器、微致動器等，皆可使用微機電或是軟微影製程技術製作，因此可整合多種生化分析功能於單一微小化晶片。由於可微型化或是陣列式高通量製作，器官晶片可以處理微量的檢測體積並進行多工平行檢測，因此可大幅降低試劑成本及檢測時間。本文介紹器官晶片系統的主要組成元件，包含微流道晶片之結構、材料的選擇，微感測器晶片、流體控制系統等設計考量。此外亦介紹近年來器官晶片在學術界的代表性研究及商業化器官晶片的公司及產品。最後本文亦探討器官晶片目前的挑戰及未來的發展方向。

Organ-on-a-chip is a novel platform for ex vivo organoid cultivation. The design is based on the lab-on-a-chip concept, consisting of various components such as microfluidics, microsensors, and microactuators. The above components were fabricated by the standard micro-electro-mechanical systems (MEMS) or soft lithography fabrication processes, enabling various biochemical analysis functions to be integrated into a single miniaturized chip. Due to its miniaturization and high-throughput cell incubation and sensing capability, organ-on-a-chip can handle small volumes of test samples and perform multiplex or multiparallel assay testing, significantly reducing reagent costs and testing time. In this article, we introduce the key components of organ-on-a-chip systems, including the geometry design and material selection of microfluidic chips, microsensors, and fluidic control systems. We also list several representative organ-on-a-chip systems in academic fields and commercialized organ-on-a-chip products in recent years. Finally, the challenges and future development directions of organ-on-a-chip are also discussed in this article.

一、前言

類器官 (organoid) 是一種源自於多功能幹細胞或是體細胞衍生的立體微型器官結構，相較於傳統的二維細胞培養和動物模型，屬於三維培養的類器官可複製關鍵的器官組織架構和功能特徵，因此能獲得許多重要的生理資訊或是模擬人體體內器官對於藥物之反應，對於再生醫學或是疾病檢測等應用皆具有極大的幫助。然而類器官雖可複製器官結構和功能，但往

往缺乏能有效檢測動態性分子的交互作用以了解體內細胞互動的複雜性，因此如何在培養類器官的同時進行原位 (in-situ) 且即時的細胞表型或是分子檢測為近年來主要的研究發展方向之一。為使類器官的培養條件能更模擬體內環境，許多研究利用器官晶片 (organ-on-a-chip) 技術，提供了一種新穎的體外平台進行類器官的培養。器官晶片的主要架構是由實驗室晶片 (lab-on-a-chip) 所衍生，可整合多種生化分析功能於單一微小化晶片，其中的關鍵元件如微流道 (microfluidics)、微感測器 (microsensors)、微致動器 (micro actuators) 等，皆是使用微機電 (micro electro mechanical system, MEMS) 或軟微影 (soft lithography) 製程技術所製作。由於可微型化或是陣列式高通量製作，器官晶片可以處理微量的檢測體積並進行多工平行檢測，因此可大幅降低試劑成本及檢測時間。此外，器官晶片若能搭配流體控制系統，可進行時序上或平行的多種流體控制，重建人體器官的生理和組織學環境，能夠比傳統基於單純細胞培養的模型更準確地再現體內組織的生理功能。目前器官晶片的技術目標為在體外模擬人體器官功能、微生理學和形態學的實驗，取代傳統細胞培養及動物實驗模型，實現不同的器官功能，用於建構複雜疾病的模型，了解新藥開發時之藥物動力學模型，使研究人員更深入地瞭解疾病機制，確定新的治療靶點並推動藥物開發和個人化醫療的應用。

二、器官晶片的組成

2.1. 器官晶片設計

在設計器官晶片進行細胞培養時，主要有四點參數需要考量：(1) 器官晶片架構設計；(2) 器官晶片材料選擇和製程技術；(3) 細胞來源的選擇 (細胞株、初代細胞、幹細胞)；(4) 微感測晶片及流體控制系統。圖一展示了器官晶片中所包含的各項模組及細胞可能生長的型態。在器官晶片的設計階段時，需要考慮目標實驗的特性。許多晶片都包含微流道，可為組織提供所需的營養和功能因子，並施加必要的生物力學力，如細胞在血管旁受到的剪應力。然而因為通道直徑、角落和輸入、輸出端都會影響流速，進而影響組織的性能，因此微流體設計必須仔細模擬，計算出對組織產生的力。進出的流道通口也須設計可保持細胞培養所需的無菌環境，並能進行培養液的更換。由於微流道中的氣泡可能會阻塞液體流動，在某些情況亦需加入氣泡捕捉器。儘管器官晶片設計架構有許多變化，但通常可以分為兩類：第一類是固體形式的器官晶片 (solid organ chips)，細胞被培養成三維組織塊，這種組織形式可以讓細胞和培養液穩定的相互作用。這種架構常用於肝臟、腫瘤、心臟和脂肪器官晶片的微柱和微孔陣列。第二類是屏障組織的器官晶片 (barrier tissue chips)，其中晶片裝置可使細胞在不同液體區域之間形成自然屏障，進而對屏障上選擇性的傳輸過程進行研究。這些架構通常存在於腸道、肺部和皮膚器官晶片中。選擇上述兩種架構和培養方式主要取決於器官晶片的最終目標功能。每個平台的目標實驗內容亦會影響其架構設計。舉例來說，屏障組織晶片最具代表性的例子就是肺臟晶片，其利用微流道晶片製程最常使用的聚二甲基矽氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 有機聚合物，利用 PDMS 具有彈性的材料特性，肺臟晶片設計在多孔 PDMS 膜的一側培養肺泡細胞，另一側培養肺內皮細胞，並在其旁設計了可流入空氣的微流道通道。利用規律性地產生負壓導致薄膜材料變形，進而使貼覆其上的細胞拉伸和放鬆，模擬肺泡組織的拉伸力。這種設計已經應用於許多其他組織，包括腸道、心臟、血腦屏障和腎小球，突顯了一個簡單的設計概念可對應到多個器官晶片之應用。

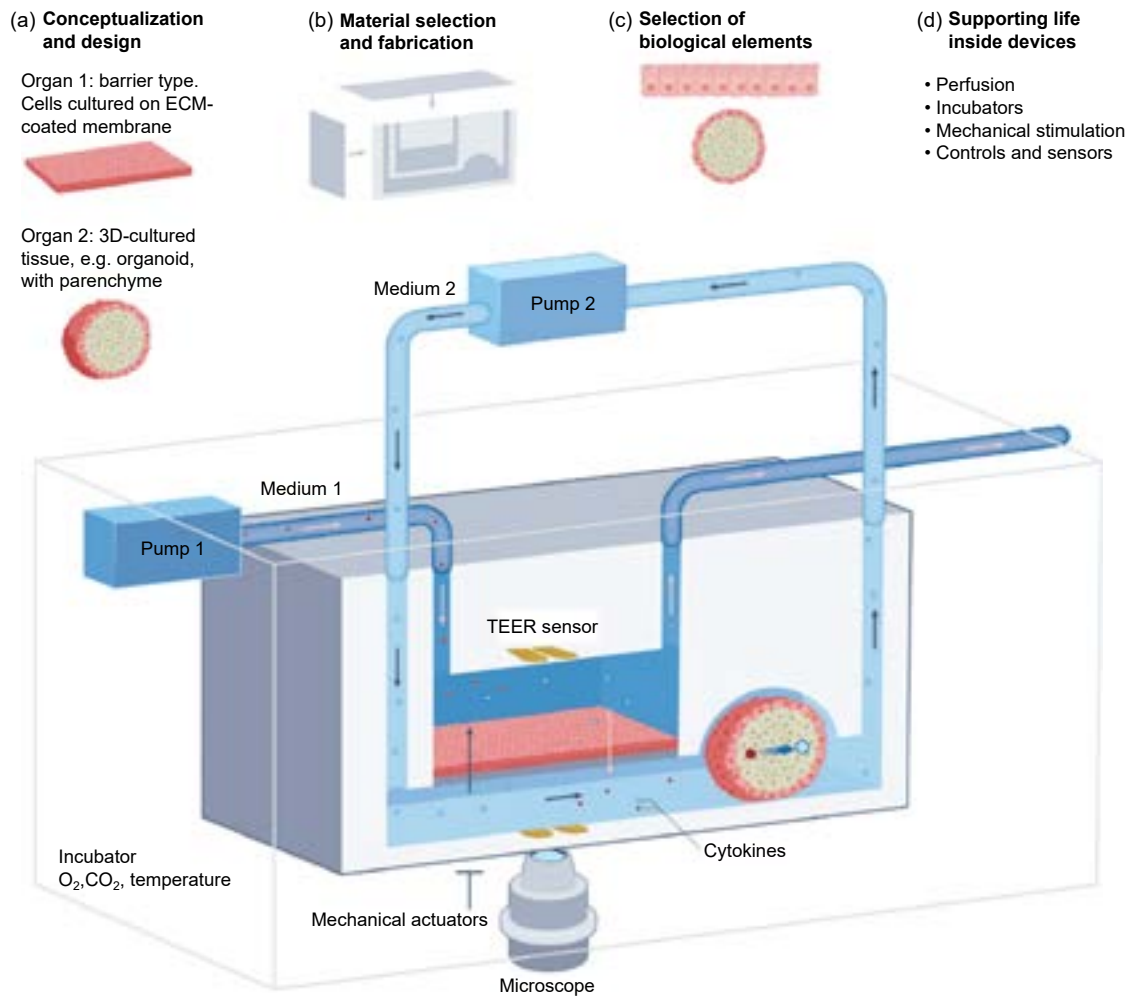


圖 1. 器官晶片的设计及架构 (图片出处: Nat Rev Methods Primers 2, 33 (2022))⁽¹⁾。

2.2. 微感測晶片

在器官芯片中可使用微感測晶片實現營養物或代謝物的原位測量，這種方法可進行即時且連續性的動態監測。例如，可利用染料配合光學式微感測器來測量溶解氧 (dissolved oxygen)，對於評估肝臟代謝功能至關重要。此外，微探針或 pH 貼片亦可同時測量溶解氧和 pH 值。然而光學之檢測方法通常需要顯微鏡或光纖，因此最好能使用自動化量測方式以減少長時間培養所需的時間和人力成本。另外細胞培養時所衍生的物質，如葡萄糖和乳酸，可使用電化學酵素的微感測晶片測量。這些近乎連續的測量非常重要，因為能即時捕捉重要的波動，與定時測量相比，這種連續性的測量方法可提供更準確的數據。此外，將感測器或貼片組合成陣列，並與組織結構在近距離或直接接觸，可以解析分析物濃度在空間上的分布。光學式顯微鏡和高內容成像 (high-content imaging) 是常用的分析方法，也是器官芯片系統中常見的細胞和組織功能測量方式。由於大多數器官芯片都是由具光學透明材料所製成，如玻璃、PDMS 和熱塑性材料，可符合傳統螢光顯微鏡或共軛焦顯微鏡成像深度的結構。因此，可在器官芯片中對細胞和組織進行原位染色，例如利用螢光染料或抗體來評估細胞存活率或特定生物標誌物數量。近年來，由於顯微鏡技術、樣本前處理 (如清洗、染色等) 和分析方面已有顯著進步，提供大量細胞和組織形態學資訊，有助於研究人員評估新型療法。此外穿

透膜電阻 (TEER) 測量可提供對任何屏障組織 (如消化道、腎臟和血腦屏障) 的完整性和滲透性觀測，微電極陣列 (MEAs) 和懸臂梁則可測量細胞的電活性和機械力的功能性，進而提供豐富的器官功能資訊。

在實驗中選擇上述何種類型的微感測晶片主要和器官晶片的種類有關。例如，模擬心臟功能的晶片可能需要使用顯微鏡觀測，並且晶片材料須由光學透明材料製成，以便觀察心臟收縮。模擬氧氣分區的肝臟晶片可以利用微流體流速來創造不同的氧氣飽和區。神經或肌肉 (心肌或骨骼肌) 平台應該包括多電極陣列或更微小的感測器以檢測細胞活動。將器官晶片及生物微感測晶片整合可達成對細胞功能 (如，代謝、活動或特定分子通路的激活) 進行即時監測。最近的自動化多組織器官系統整合了一系列晶片感測器，包括與微電極相連的電化學激發免疫生物感測器 (chemically activated immunobiosensors)、極小型顯微鏡和光學 pH、氧氣和溫度監測器。這一技術可在器官晶片的微環境中進行非侵入式且連續地訊號監測⁽²⁾。總體而言，選擇器官晶片系統中合適的檢測方式主要取決於要解決的問題。與傳統的動物模型相比，器官晶片系統更容易實現直接、原位且即時的檢測。近年來，由於微感測晶片的應用性大幅提高，此可有助於器官晶片系統的開發，擴展器官晶片系統可能的即時檢測參數。

2.3. 流體控制系統

器官晶片中的流體控制系統主要用於模擬體內的循環系統，促進營養物質和廢物的運輸。主要推進流體的設備為各式幫浦，包括注射幫浦 (syringe pump)、微閥驅動幫浦 (microvalve-driven actuator pump) 和蠕動幫浦 (peristaltic pump)，或者無幫浦的靜水壓系統。幫浦的選擇取決於灌注流的類型：(1) 一次通過流或 (2) 循環流。一次通過流能確保穩定的營養物質供應，但組織間物質傳輸只能由上游沿著流體下游的單一方向。循環流則可提供器官晶片間的化學分子的傳輸和接收，但可能導致廢物積聚。上述的灌注方法被稱為器官晶片的物理性耦合 (physical coupling)。另一種驅使器官晶片相互作用的方法是功能性耦合 (functional coupling)，即在單一器官晶片 (如肝臟) 和另一器官晶片 (如腎臟) 之間按順序傳遞介質。功能性耦合消除了幫浦的複雜性，以及在不同器官晶片模組之間建立連結的需求。不過，由於某些細胞分泌的因子具有高度可降解的特性，因此從一個器官晶片轉移介質到另一個器官晶片可能導致細胞分泌因子的有效數量下降，剩餘的因子數量不足以在目標器官晶片中引發反應。在此情況下，物理耦合的流體灌注方式較為合適。

三、器官晶片的近年研究介紹

3.1. 整合微感測器及多通道微流道之器官晶片

近年來許多研究提出整合各式微感測器及多通道微流道晶片進行類器官培養和即時監測之器官晶片，其中圖二整理了目前相關研究的系統示意圖。舉例來說，Dornhof 等人建立了一種整合電化學感測器的微流道裝置，用於測量氧氣、乳糖和葡萄糖，如圖 2(A) 所示⁽³⁾。這些感測器可以監測三維細胞培養液中腫瘤細胞的氧氣和營養攝取動態。他們的研究中使用了乳癌幹細胞 (BCSC1)。該晶片由兩個帶有相鄰微通道的細胞培養區所組成。兩個隔間腔體可以進行細胞的共同培養，同時培養區之間的相互作用亦可被中間通道中斷。另一個例子是 Zhang 等人製作的微流道系統，其中包含串聯兩個獨立的器官晶片及使用電阻抗感測器來進行即時類器官分子分泌的監測，如圖 2(B) 所示⁽⁴⁾。此感測器可每兩小時由自動流體控制面

板更新。透過整合到系統中的感測器，可以監測心臟和肝臟晶片器官在 DOX 誘導的類器官毒性下的相互作用。最後一個例子是 Bavli 等人創建一個肝臟晶片，能夠透過電化學感測器即時監測代謝功能和粒線體功能障礙，如圖 2(C) 所示⁽⁵⁾，藉由電腦控制的微流體控制系統可依序對生物反應器流出物進行採樣、清洗並重新校準感測器。這種創新方法提供了對粒線體功能障礙的更動態的理解，突顯了其對藥物毒性和疾病過程的潛在影響。

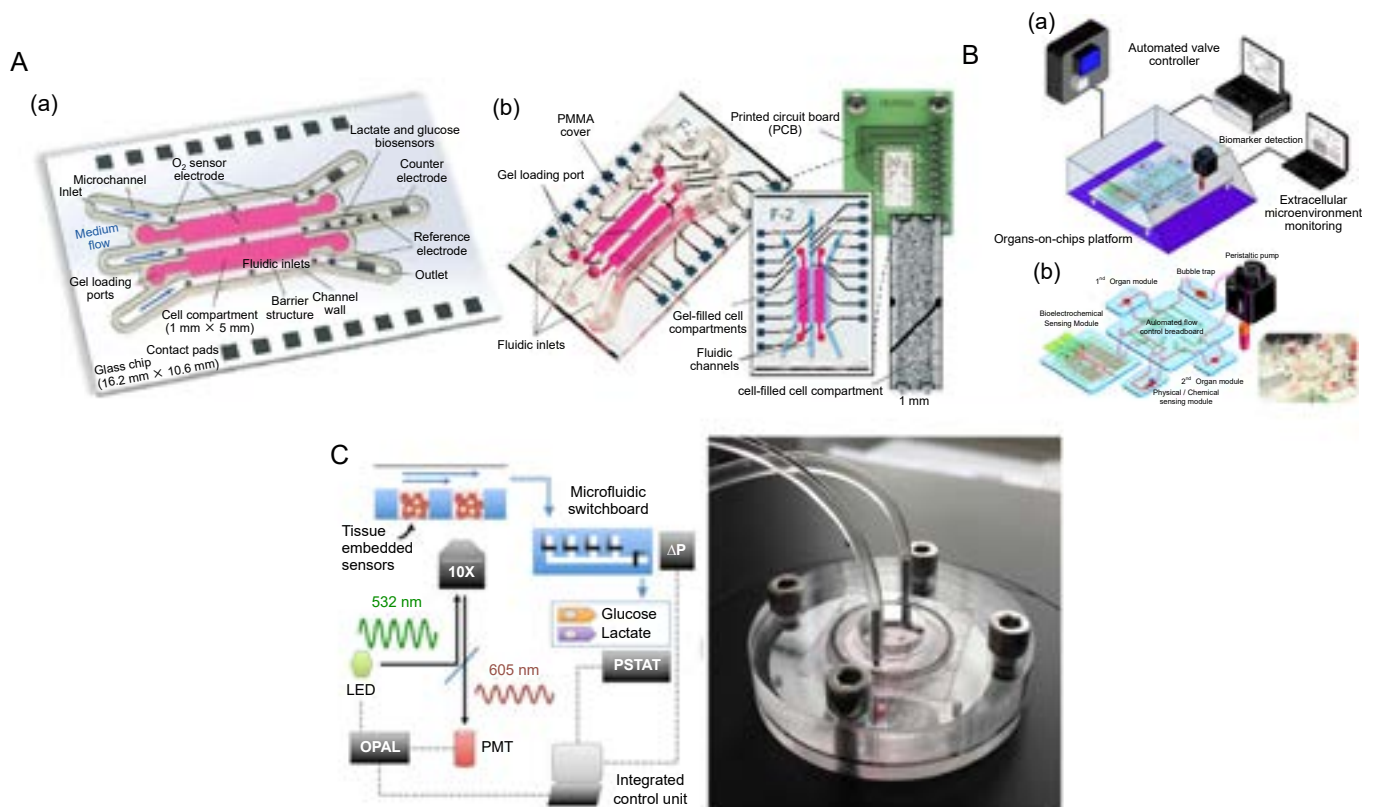


圖 2. 用於類器官培養之微流道晶片示意圖 (A) 整合電化學感測器的微流道裝置，用於測量氧氣、乳糖和葡萄糖⁽³⁾，(B) 串聯兩個獨立的器官晶片及使用電阻抗感測器來進行即時類器官分子分泌的監測⁽⁴⁾，(C) 電化學感測器即時監測代謝功能和粒線體功能障礙⁽⁵⁾。

3.2. 培養淋巴器官的微流道控制系統

本實驗室過去已有多項使用微流道控制系統進行器官晶片的開發經驗。舉例來說，我們過去開發由三維圓柱形水凝膠微流道所構建的淋巴晶片系統。如圖 3 所示，該微流道之液體流動由脈動流微流體控制系統所控制。流道晶片部份，我們使用模板製程技術製造兩個平行排列的三維水凝膠微流道以模擬毛細血管和淋巴管，由於水凝膠具有易變形及較高的氣體和水滲透性，可以更容易的產生因流體流動所造成的力學刺激 (脈動流或靜水壓力) 並監測特定生物分子在流道中擴散或是從一個流道傳輸到另一個流道的現象。此系統另一個重要的模組是流體控制系統，主要是由訊號產生器所控制的蠕動幫浦所組成，可產生各種脈動流模式以模擬淋巴系統中的真實流體流動狀況。最後，我們預期將所有模組裝入一個具有壓力控制的封閉腔室中。其產生的高壓力環境可以對三維水凝膠微流道晶片產生均質性等向性壓縮作用，用於模擬淋巴水腫或肌肉收縮等生理條件。此外此微型化的系統體積可直接放置於螢光顯微鏡的載物台上即時觀察細胞形態或生物分子 (例如細胞因子、生長因子、胞外體) 在微

流道之間的擴散。總體而言，此淋巴晶片系統是一個可調控多種力學及化學刺激參數的器官晶片平台，將可幫助臨床醫生及研究人員在體外模擬各種淋巴系統之生理或病理狀況，並進行免疫治療方法研究及抗癌藥物開發，進而節省臨床試驗成本和動物試驗中的動物犧牲。

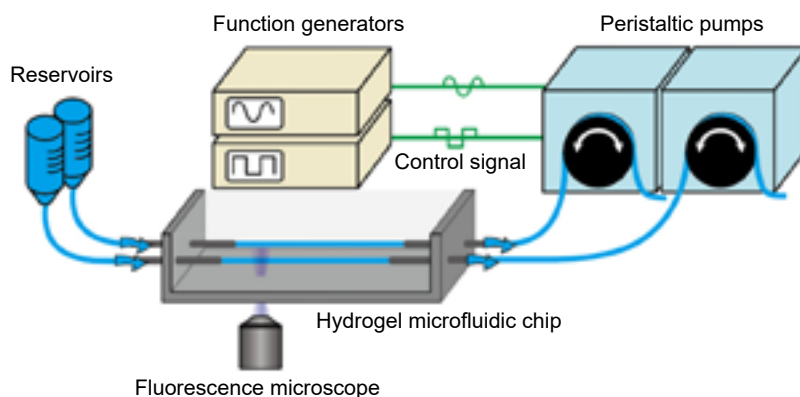


圖 3. 三維圓柱形水凝膠微流道所構建的淋巴晶片系統實驗架構示意圖 (圖片出處：國立臺灣大學黃念祖教授生醫光微流道系統實驗室)。

3.3. 可進行剪應力及缺氧環境刺激的細胞培養微流道系統

另一個器官晶片的研究案例是開發出可培養人類靜脈內皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cell、HUVEC) 的微流道晶片。該晶片可藉由通道寬度和流速控制，在細胞培養過程中施加不同的剪應力強度。將細胞接種到晶片中後，可將此微流道晶片連接到注射幫浦，如圖 4(A) 所示。注射幫浦可控制流速和流動時間，以實現培養液交換。透過這個系統，也可固定流速或以各式的流動模式，如脈動流或任何機械力來刺激細胞，亦可在培養液中引入藥物並控制刺激細胞的時間。另一個可對培養中細胞產生刺激的參數是氧氣濃度，我們在細胞培養流道區的上方製作一可即時吸取氧氣的微流道，藉由在流道中混合連苯三酚和 NaOH 來消耗氧氣，由於 PDMS 材料具有透氧性，當缺氧通道下方的氧氣被消耗後，氧氣將再次擴散回介質中並引起再氧合，因此可以在培養細胞的微流道晶片中建立氧氣梯度。此外，此氧氣梯度也可同樣透過注射幫浦控制，以產生循環缺氧條件。為了解流道中氧氣濃度分布的情形，我們使用了多重物理有限元素分析軟體 COMSOL 進行模擬，如圖 4(B) 所示，可發現在缺氧流道的正下方氧氣濃度趨近於零，在其下游區域則因 PDMS 的透氧性造成的回氧效應，會有一氧氣濃度梯度產生。為達到即時量測微流道中氧氣濃度梯度，我們使用 PreSens 公司開發之氧氣感測器來即時監測氧氣濃度。氧氣測量的方式為透過在微流道中打一個 2 mm 的孔，將感測器插入，感測器內部的螢光材料即可被透過光纖傳輸的雷射激發。之後，反射光將傳輸回讀取器，其相位和強度將被記錄，透過這些數值計算將可推估出氧氣濃度。如圖 4(B) 所示，當我們停止連苯三酚的導入，氧氣消耗停止，氧氣水平在 15 分鐘內恢復到正常狀態，接著重新注入連苯三酚，開始新的缺氧循環。為了解細胞在此培養過程中的即時反應，我們使用活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 和 F-肌動蛋白 (F-actin) 的螢光染劑，監測細胞受到剪應力和缺氧的刺激下，上述分子的分泌量變化。目前我們是使用標準的螢光顯微鏡進行量測，但未來也希望可整合模組化及高通量的免標定 (label-free) 式的表面電漿共振 (surface plasmon resonance, SPR) 或是電化學 (electrochemical) 感測模組對細胞的代謝物實現即時、連續且長期的監測。這部份的檢測挑戰在於如何功能化修飾目標分子的抗體或適體在感測晶片上，使感測的專一性提高。

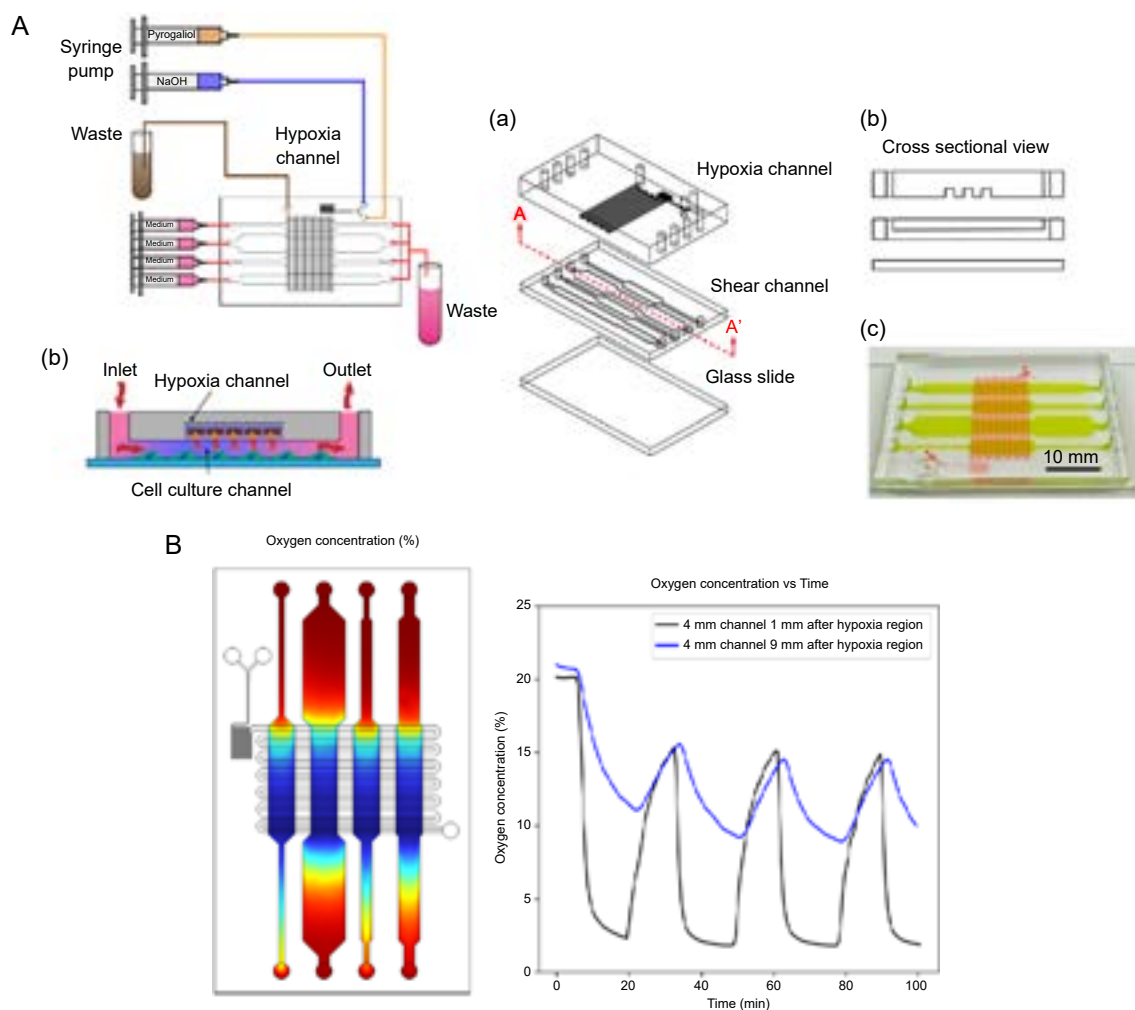


圖 4. (A) 可進行剪應力及缺氧環境刺激的細胞培養微流道晶片及控制系統示意圖，(B) 使用 COMSOL 模擬及氧氣感測器量測之氧氣濃度分布圖 (圖片出處:國立臺灣大學黃念祖教授生醫光微流道系統實驗室)。

四、商業化器官晶片的公司及產品

隨著器官晶片的技術日益重要，市面上亦有許多新創公司投入器官晶片的開發與生產，讓研究者能以更低的門檻進行器官晶片的相關研究。即使都使用微流道技術，各家公司所著重的方向皆不同並各具特色。以下將介紹四家致力於將器官晶片商用化的新創公司。

4.1. Emulate

Emulate 公司是由哈佛大學 Donald E. Ingber 教授之研究團隊在 2023 年所創立。創始人 Ingber 教授在 2010 年研發了世界上第一個成功的肺器官晶片。現在該公司致力於研發各式器官晶片，旨在模擬人體器官的微環境，以便於進行更精確的生物醫學研究和藥物開發。該公司主要的產品結構如圖 5(a) 所示。該晶片是由 PDMS 所製成，分為上下兩個通道，中間用一層透孔 PDMS 膜分開。在上通道培養肺泡細胞，膜的另一側培養血管內皮細胞，就可以完成模擬肺部的肺晶片，此外兩側的真空通道 (vacuum channel) 是個類似氣囊的結構，可

通入或抽出氣體使得中間的細胞受到週期性伸展的壓力，模擬人體呼吸。肝臟、腸道等等器官都可以透過在不同的通道培養不同的細胞而在這個簡單的流道內方式製作出來。除晶片設計外，Emulate 公司亦提供專屬的機台提供培養液循環換液的功能，如圖 5(b) 所示，可免去使用者需要額外使用幫浦以及針筒幫浦僅有單向供給而無循環功能的困擾，循環使用的培養液更可以抽取其中累積的細胞分泌物進行分析。

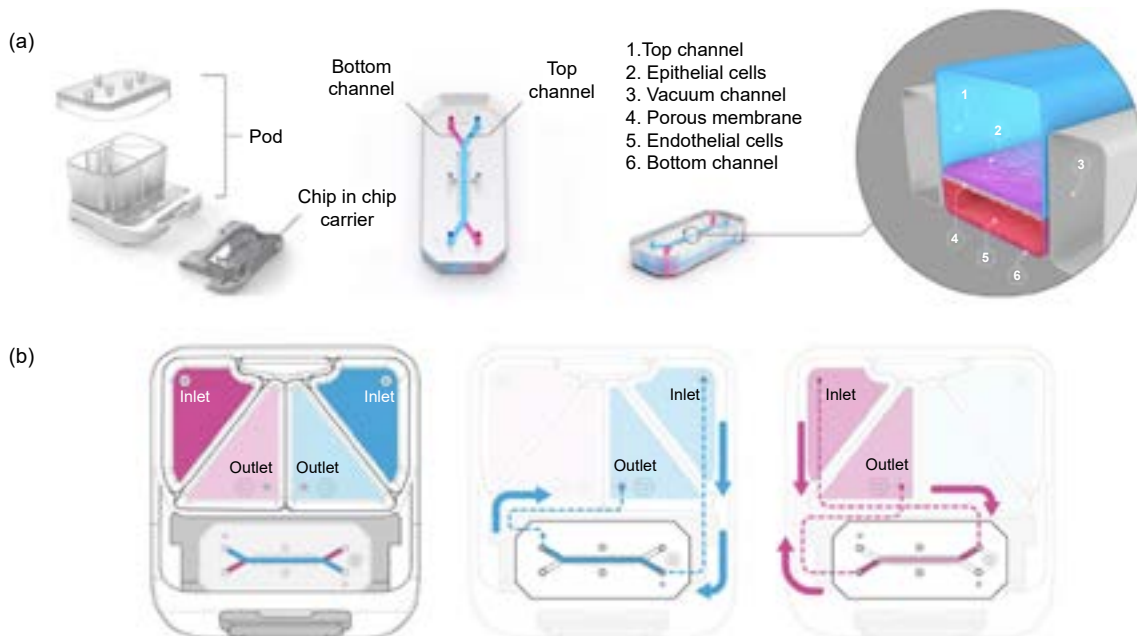


圖 5. Emulate Chip-A1 基本器官晶片套組 (a) 包含一個流體交換系統以及微流道器官晶片。細胞培養區由兩個流道上下夾一 PDMS 膜所組成，兩側夾以真空通道，(b) 流體交換系統示意圖。(圖片出處：<https://emulatebio.com/resources/a1-basic-research-kit-data-sheet/>)⁽⁶⁾。

4.2. Hesperos

Hesperos 是 2015 年創立於美國的器官晶片公司，相比於製作構造相對簡單的晶片，該公司更注重新於多器官間的交互作用，希望能做到人體晶片 (human-on-chip) 的目的，將人體的多個器官功能同時模擬在同一片晶片上，如圖 6(a) 所示。因設計的晶片有著更大的體積也更複雜的分區，在圖 6(b) 中，PDMS 的晶片有三層結構，最上層用來連接流體的出入口，第二層則是定義了流體的流動方向，第三層則是定義細胞培養區。細胞培養區分為五個區域，如圖 6(b) 中所示，這五個區域構成兩個系統，第一個是肝臟骨髓系統 (1、3 號區)，用來研究藥物經由肝臟代謝後所影響骨髓的生長情形。另一個是肝臟、心臟、癌症細胞系統 (1、2、5 號區)，用來研究化療藥物在殺死癌細胞的同時也會對心臟產生危害。各個器官透過連通的培養液進行互動，而非之前介紹的晶片，直接將不同的細胞養在一起使其交互作用，此器官晶片彼此之間有較遠的距離，因而較類似於器官在人體內的架構。開發者甚至將電極整合其中，如使用微懸臂梁來量測心肌細胞的機械力或用微電極陣陣量測心肌細胞的電流及給與心肌刺激，這也展示了未來可以整合更多種類的感測器到晶片中來監控器官的活動，相比於直接把感測器嵌入人體中可帶來更多安全及方便性。

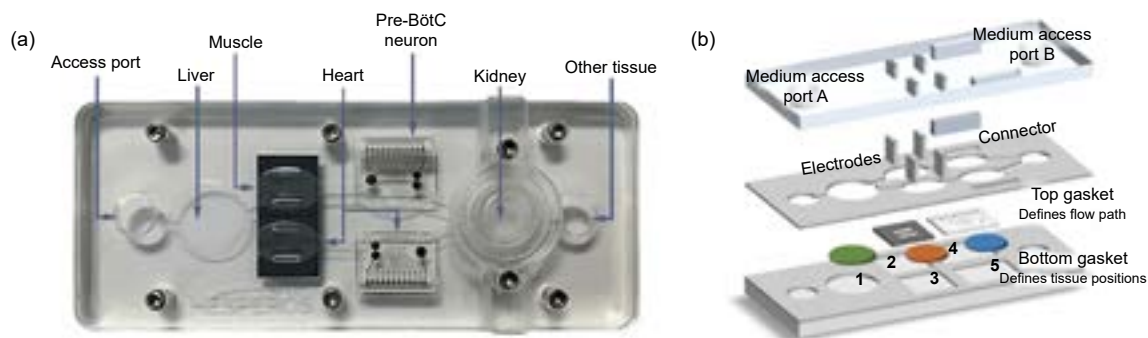


圖 6. Hesperos 開發的人體晶片 (a) 人體晶片示意圖，晶片中包含肝、心臟、腎、神經元等，(b) 晶片三層示意圖，1 號區：肝臟細胞、2 號區：心臟細胞、3 號區：骨髓細胞、4 號區：微電極陣列、微懸臂梁感測區、5 號區：乳癌細胞 (圖片出處：<https://hesperosinc.com/>)⁽⁷⁾。

4.3. Mimetas

相較於前兩者公司主要為設計器官晶片流道和整合感測晶片，2013 年在德國成立的 Mimetas 公司著重於可進行高通量檢測的微流道晶片開發。該公司的產品 OrganoPlate 可同時具有四十個以上獨立的器官晶片 (圖 7(a))，透過在中間注入水膠，兩側的流道可各自培養不同的細胞，再將其上方加上裝有培養液的儲存槽，可藉由左右搖晃的方式達到循環換液的目的，解決了如此多個獨立的器官晶片需要大量管線及幫浦交換液體的問題。其晶片架構如圖 7(b) 所示，兩個通道一側是培養血管內皮細胞模擬血管，另一側則是培養腫瘤細胞及纖維母細胞模擬腫瘤細胞在胞外基質的環境，中間的通道被通以水膠，水膠能作為物理阻礙來隔開兩個通道內的細胞的同時，仍具有通透性，如此癌細胞得以與血管細胞互動。這樣的模型可以模擬癌細胞在體內的微環境，進而研究癌細胞的入侵、轉移的行為，有別於傳統使用培養皿的細胞培養，此類型的培養方式為三維培養，因血管內皮細胞不是生長在一個平面上，而是形成管狀，此外癌細胞也被種在非平面的結構上，讓癌細胞可以在三維的結構中移動，能更有效重現體內的環境。接著利用晶片盤具有高通量的特性，研究者得以同時間測試

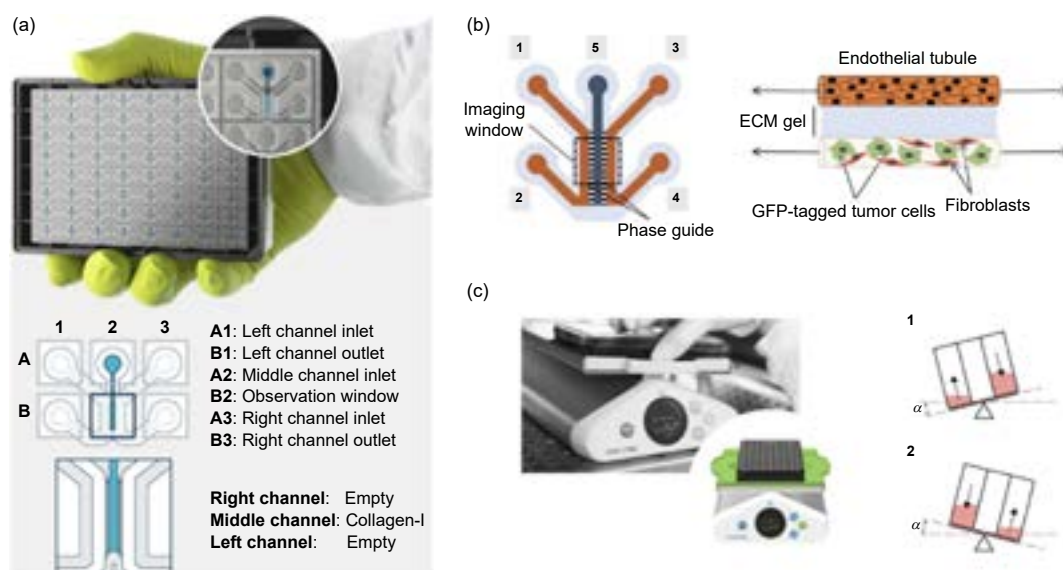


圖 7. Mimetas OrganoPlate (a) OrganoPlate 示意圖 (圖片出處：<https://www.mimetas.com/en/organoplate-sup-sup-product-overview/>)，(b) 癌細胞入侵血管模型⁽⁸⁾，(c) 液體循環系統⁽⁹⁾。

多樣不同的藥物，蒐集大量藥物的測試資料，進一步加速藥物開發。圖 7(c) 則展示另一個使用 OrganoPlate 的器官晶片案例，由 Morelli 等人所開發之腸道器官晶片用以研究上皮細胞對於腸毒素的反應，為進行長時間及連續的培養液交換，此 OrganoPlate 放置在一震盪平台 (OrganoFlow rocker) 上進行連續且持續晃動的培養液交換，藉以進行長時間的細胞培養。

4.4. PreciGenome

PreciGenome 公司提供數種可自訂條件的器官晶片系統，該系統能夠重建動態體內條件，以模擬細胞天然環境的生化和生物物理特徵。此系統需要結合外部的流體控制系統和微流道晶片，提供多通道導入或試劑再循環功能，確保細胞能培養多達數週。圖 8 展示了兩種使用 PreciGenome 器官晶片系統架構圖⁽¹⁰⁾。第一個例子是肝臟／心臟器官晶片 (圖 8(a))，主要模擬肝臟和心臟器官的交互作用。細胞株主要培養於培養液可再循環的微流道晶片上模擬心臟和肝臟。藉由 PG-MFC 的流量控制器提供壓力源，透過 2 位元 / 6 端口閥門將試劑從儲液器 1 透過肝臟／心臟晶片泵送到儲液器 2。該系統亦可將 PG-MFC 流量控制器與一個 2 位元 / 6 通閥和兩個三通閥結合，讓兩個獨立儲液器中的緩衝液來回流動，但仍可保

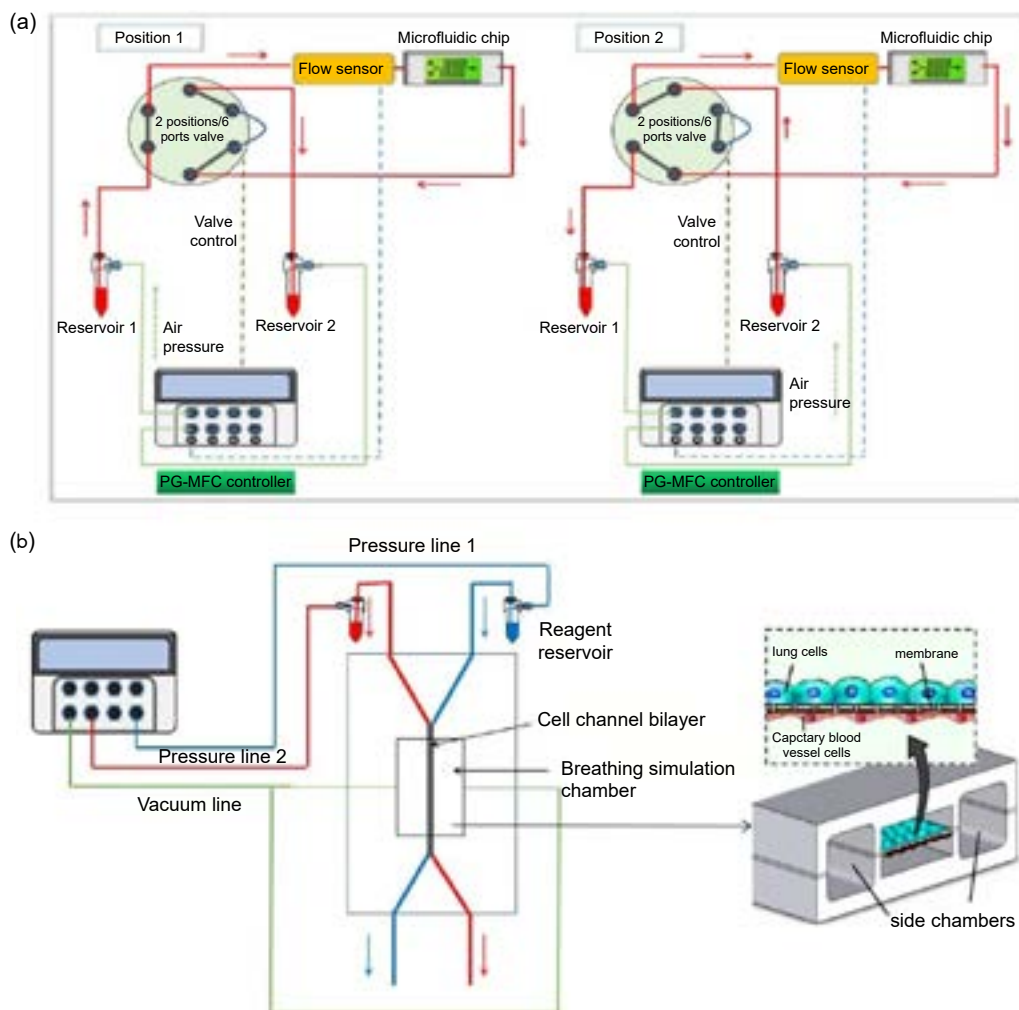


圖 8. PreciGenome 之微流道控制系統可進行連續性或即時培養液輸入輸出示意圖。(a) 肝臟／心臟器官晶片，(b) 肺臟器官晶片 (圖片出處：<https://www.precigenome.com/microfluidic-fluidic/organ-on-a-chip-system>)⁽¹⁰⁾。

持微流道晶片中的單向流動。另一個例子是肺臟器官晶片 (圖 8(b))，主要使用兩個壓力源和一個真空源，透過 PG-MFC 流量控制器連接到晶片的不同入口。兩條壓力線推動不同的培養基輸送到晶片中，以模擬血液流入肺部並透過細胞通道雙層交換化學物質。此外真空管線連接到微流道晶片的側室中進行膨脹和收縮，以模擬肺部的呼吸過程。在上述的例子中，皆需具有可多重獨立控制的流量控制系統，搭配流量感測器的回授控制，對於需穩定且連續提供培養液的類器官晶片極為重要。

五、結論

目前主要使用微流道晶片進行類器官培養的架構多為學術單位或是新創公司，然而上述開發的系統能進行的細胞培養時間皆有限，若需進行複雜的流體控制或進行即時、原位之多重生物標誌物量測，也會面臨系統操作複雜，不易使用的問題，因此如何降低使用者其操作門檻，提供和市售醫療儀器可相比或是更好的檢測結果，使醫生或是醫療相關研究人員願意嘗試使用或進行合作，獲取更多的臨床試驗樣本及成果，是本領域日後發展仍需持續努力發展的目標，也期許未來有更多國內外的公司投入資源在器官晶片系統的開發，使其能應用於臨床治療、再生醫學、新藥開發和早期疾病檢測等方向。

參考文獻

1. Leung, C.M., de Haan, P., Ronaldson-Bouchard, K. et al., *Nat Rev Methods Primers.*, **2** (34), 33 (2022).
2. Low, L.A., Mummery, C., Berridge, B.R. et al., *Nat Rev Drug Discov.*, **20**, 345 (2021).
3. J. Dornhof, J. Kieninger, H. Muralidharan, J. Maurer, G. A. Urban, and A. Welten, *Lab on a Chip*, 22 (2), 225 (2022).
4. Y. S. Zhang et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114 (12), E2293 (2017).
5. D. Bavlí et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 113 (16), E2231 (2016).
6. McAleer, C. W., Long, C. J., Elbrecht, D., Sasserath, T., Bridges, L. R., Rumsey, J. W., ... & Hickman, J. J., *Science translational medicine*, 11 (497), eaav1386 (2019).
7. Ozer, L. Y., Fayed, H. S., Ericsson, J., & Al Haj Zen, A., *Frontiers in Oncology*, 13, 1269376 (2024).
8. Morelli, M., Cabezuolo Rodriguez, M., & Queiroz, K., *Scientific Reports*, 14 (1), 5797 (2024).
9. Please refer to the website: <https://www.precigenome.com/microfluidic-fluidic/organ-on-a-chip-system>

作者簡介

黃念祖先生為美國密西根大學安那堡分校機械工程所博士，現為國立臺灣大學電機系及生醫電子與資訊學研究所教授。

Nien-Tsu Huang received his Ph.D. in Mechanical Engineering from University of Michigan, Ann Arbor. He is currently a Professor in the Department of Electrical Engineering and Graduate Institute of Biomedical Electronics and Bioinformatics at National Taiwan University.

熊彥程先生現為國立臺灣大學生醫電子與資訊學研究所碩士生。

Yen-Cheng Hsiung is currently a M.S. student in the Graduate Institute of Biomedical Electronics and Bioinformatics at National Taiwan University

王嘉珮小姐現為國立臺灣大學電機工程系大學生。

Chia-Pei Wang is currently a B.S student in the Department of Electrical Engineering at National Taiwan University.

器官晶片技術與應用－以肺晶片為例

Organ-on-a-chip Technology and Application –Taking Lung-on-a-chip as an Example

陳冠宇、石昂東、李珊宣

Guan-Yu Chen, Ang-Tung Shih, Shan-Hsuan Li

長久以來，實驗動物在新藥開發中扮演著重要角色，然而越來越多研究顯示，動物實驗結果與人體臨床試驗之間存在巨大差異，在研發上需更有效的試驗方法，預測藥物在人體內的功效及安全性，其中器官晶片 (organ-on-a-chip, OoC) 技術能準確模擬體內複雜結構、細胞生理等優勢，提供更精準且可靠的實驗結果，加速臨床前藥物研發過程，近年已受到國際上極大關注，本文將依序介紹 OoC 的研發背景、核心技術，並以肺晶片 (lung-on-a-chip, LoC) 為例說明相關應用實例。

For a long time, animal testing has played a crucial role in the development of new drugs. However, an increasing number of studies have shown significant differences between the results of animal experiments and human clinical trials, highlighting the need for more effective testing methods to predict the efficacy and safety of drugs in humans. Among these, organ-on-a-chip (OoC) technology, with its ability to accurately simulate complex bodily structures and cell physiology, offers more precise and reliable experimental outcomes, thereby accelerating the preclinical drug development process. This technology has garnered immense international attention in recent years. This article will sequentially introduce the background of OoC research, its core technologies, and present the lung-on-a-chip (LoC) as an example to illustrate related application instances.

一、藥物開發與器官晶片

一項藥物的開發，通常需耗費超過 10 年及 10 億美元才能成功走向市場，而造成研發進程如此緩慢與高成本的原因，主要是開發過程中的高失敗率，根據全球臨床試驗龍頭公司 IQVIA 的研究報告，在 2022 年時仍有超過 94% 經過動物安全及有效性實驗的候選藥物，最終無法通過人體臨床試驗⁽¹⁾。

回頭來看，現今藥物試驗大多仰賴細胞培養與動物實驗，其中細胞培養雖有快速且一致性高的實驗參數，但其平面的培養環境無法模擬體內複雜的三維組織結構，甚至重現生理功能。而動物模型雖為臨床前驗證的黃金標準，可評估藥物在生物體內的釋放、吸收與代謝等

作用，但由於物種間差異，其結果通常無法有效類推至體內療效、副作用與毒性。其中在毒性評估上，若藥物在動物實驗中出現危害性，將面臨終止開發命運，但有時也導致許多潛在良藥被錯誤的排除，從另一方面來看，若動物實驗誤將有毒藥物識別為安全，也可能會讓對人體有害的藥物進入市場，引發潛在公共健康危機⁽²⁾。

面對如此挑戰，基於生物晶片和微流道技術的 OoC 應運而生，透過材料、化學、物理、細胞生物學和工程技術結合，能重現人體器官複雜度的三維培養環境，同時還能以動態輸送方式模擬血液循環，讓養分及細胞代謝物維持在可控濃度梯度，幫助細胞在形態、相互作用及功能上都更加接近體內自然狀態。相比於過去二維細胞培養或動物實驗，OoC 能更快、更準確的預測藥物在體內的療效和潛在毒性，加速研發過程並降低成本。此外，這種晶片也成為疾病研究和個人化醫療的有力工具，近年已有不少研究提出癌症、慢性病甚至是遺傳疾病的晶片模型，這不僅可幫助研究人員了解疾病發展過程和病理機制，更可以針對個體差異提供精準的醫療決策⁽³⁾；值得一提的是，在 2022 年底美國國會正式簽屬「FDA 現代法案 2.0」，允許藥廠利用此替代方法加速臨床前藥物開發，證明 OoC 在醫藥領域受到的重視與前景。

儘管此項技術在臺灣仍處於發展階段，但已有越來越多學研單位和新創公司投入研發，與此同時，國科會、國研院也提供大力支持，推進替代技術的發展與深耕。而在晶片技術發展過程中，由於空汙問題日益嚴重及 COVID-19 疫情的爆發，全球對呼吸道疾病的需求和關注不斷提升，肺部的 OoC 技術 (LoC) 已成為人體中需求占比最高的器官之一，這將有助理解空汙、病毒和細菌對肺部健康危害，提供更準確有效的藥物開發結果，未來這種晶片技術甚至不僅限於藥物研究，更能融合臺灣資通電優勢，擴展至疾病預防、美妝保養等領域，在促進產業創新和科技發展同時，替全球帶來更好的健康效益。

二、器官晶片的關鍵技術

OoC 目標是在晶片中模擬人體器官微環境，提供理想的體外模型做為動物實驗替代選擇，為了準確達成上述目標，晶片會根據不同目標器官，從材料、結構、細胞種類甚至是培養方式等不同面向進行設計，本章節將介紹 OoC 的製作材料、生物塗層、動態培養環境、結構以及目前需求最多之 LoC 的獨特環境介紹。

1. 常見的 OoC 材料

OoC 製作材料會因實驗目的、晶片結構與各式細胞對於材料特性需求而有所變動，常被使用的有玻璃、彈性合成材料和熱塑性塑膠等。其中，玻璃雖有優秀的化學穩定性、高親水性和出色的光學性質，但透氣度欠佳、加工不易且價格高昂，因此近年來更多研究使用聚二甲基矽氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 作為 OoC 製作材料。PDMS 因其具透光度、透氣性、高生物相容性且富有彈性的特性，可用於對細胞施加機械刺激，且 PDMS 製造容易，只需將其注入加工模具並低溫烘烤固化即可完成製作，使其成為生物應用之常見選擇，但 PDMS 容易吸收或沾黏化學品，於藥物或是毒化物測試時造成不可忽視之影響⁽⁴⁾。聚氨酯 (polyurethanes, PU) 在保有與 PDMS 相似優點的同時，還可以防止小分子化學品吸收，並抵抗水和紫外線導致降解，不過 PU 容易受到光和溫度等因素影響而老化，熱穩定性也較差。最後，聚甲基丙烯酸甲酯 (poly (methyl methacrylate), PMMA)，也就是俗稱的壓克力，在穩

定性、化學相容性以及透光度上表現優異，還可透過射出成型或熱壓等方式大量製作，然而，PMMA 對於紫外線和熱的耐受度較低，容易產生變形，不適用於生物實驗中常使用之紫外線或高溫高壓滅菌，因此需特別注意材料清消方式。綜上所述，不同材料各有其優缺點 (表 1)，因此當研究人員在製作 OoC 時，需要充分考慮細胞特性、實驗需求和材料性質，才可確保實驗結果不會因材料而受到影響⁽⁵⁾。

表 1. 常見 OoC 材料之比較。

材質	優點	缺點
玻璃	化學穩定性、高親水性和光學性質	透氣不佳、加工不易和價格昂貴
PDMS	透光度、透氣性、生物相容性、彈性和製作容易	易吸收或沾黏化學品
PU	透光度、生物相容性、防止小分子化學品吸收和抵抗由水或紫外線引發之降解	易因光、溫度和氧影響老化與熱穩定性差
PMMA	穩定、化學相容性、透光度和生產便捷	對紫外線和熱之耐受度低，較易變形

2. 生物塗層

人體除了血球細胞外，多數細胞都需要細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 以協助維持細胞功能、生長型態和穩定性，此外 ECM 的軟硬度和結構排列也會影響細胞分化和相互作用，因此在晶片中培養細胞時，會根據不同細胞選擇對應的 ECM 塗層，作為細胞生長支架並增加其在晶片內貼附性及細胞表徵維持 (圖 1)。常見 ECM 材料包括膠原蛋白 (collagen)、基質膠 (matrigel) 和明膠 (gelatin) 等，它們不但具有優良的生物相容性，也不需額外的化學修飾即可協助細胞貼附，為各研究之 ECM 首選⁽⁶⁾。

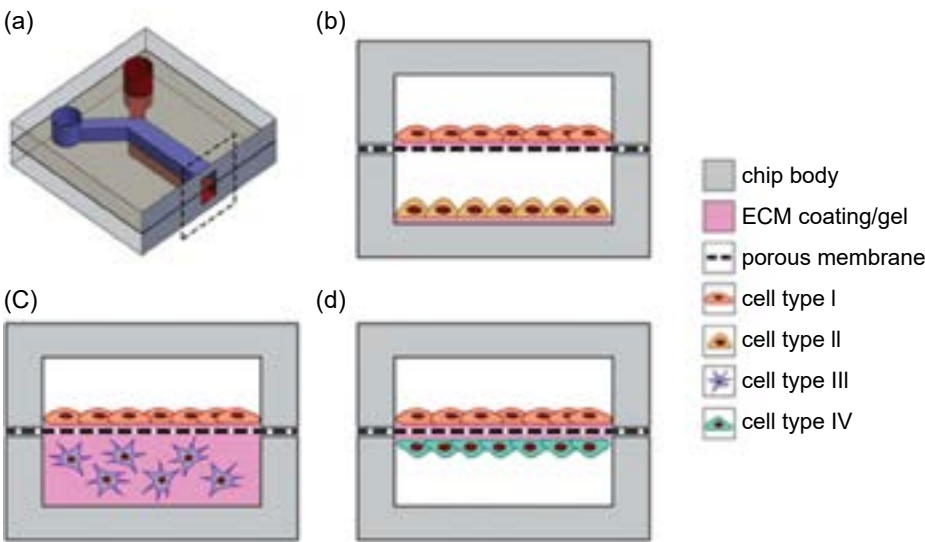


圖 1. ECM 於 OoC 中之整合示例。(a) 雙流道 OoC 的截面示意圖。(b) 藉由 ECM 塗佈輔助細胞在多孔膜上或下層流道貼附。(c) 以水凝膠灌注的方式模擬 3D 培養環境。(d) 在多孔薄膜的上下兩側塗佈 ECM 進行細胞的共培養⁽⁷⁾。

3. 動態培養環境

傳統細胞培養系統雖然提供了穩定生長環境，但缺乏模擬人體血液流動產生的流體剪切應力 (fluid shear stress, FSS) 和細胞在體內會受到各式機械刺激，這些微小應力對於研究細胞生理現象至關重要 (圖 2)。研究指出，動態培養系統以幫浦和管道連接提供流體流動，不但可模擬血液中循環養分供給及代謝反應，也藉施加 FSS 促使細胞更完整分化⁽⁸⁾。FSS 不僅對血管內皮細胞的健康狀態和血管功能具有重要作用，也影響細胞形態、增殖、黏附和訊號傳遞等生理過程。此外，透過對 OoC 施加循環的收縮或拉伸力，即可模擬如呼吸運動過程中對肺部細胞的拉伸和舒張、心肌細胞搏動、小腸細胞蠕動等過程，重現體內各種機械力。對於 LoC，除了機械力的施加外，如何準確的模擬人體呼吸的氣流也十分重要，因為氣體流動也能賦予肺部細胞優良的分化表現。以上這些機械力的施加不僅有助於刺激細胞分化，還能促使細胞間有更緊密的相互黏附以及貼近體內排列結構，從而更全面模擬人體內生理環境，實現對人體生理功能之模擬與評估⁽⁹⁾。

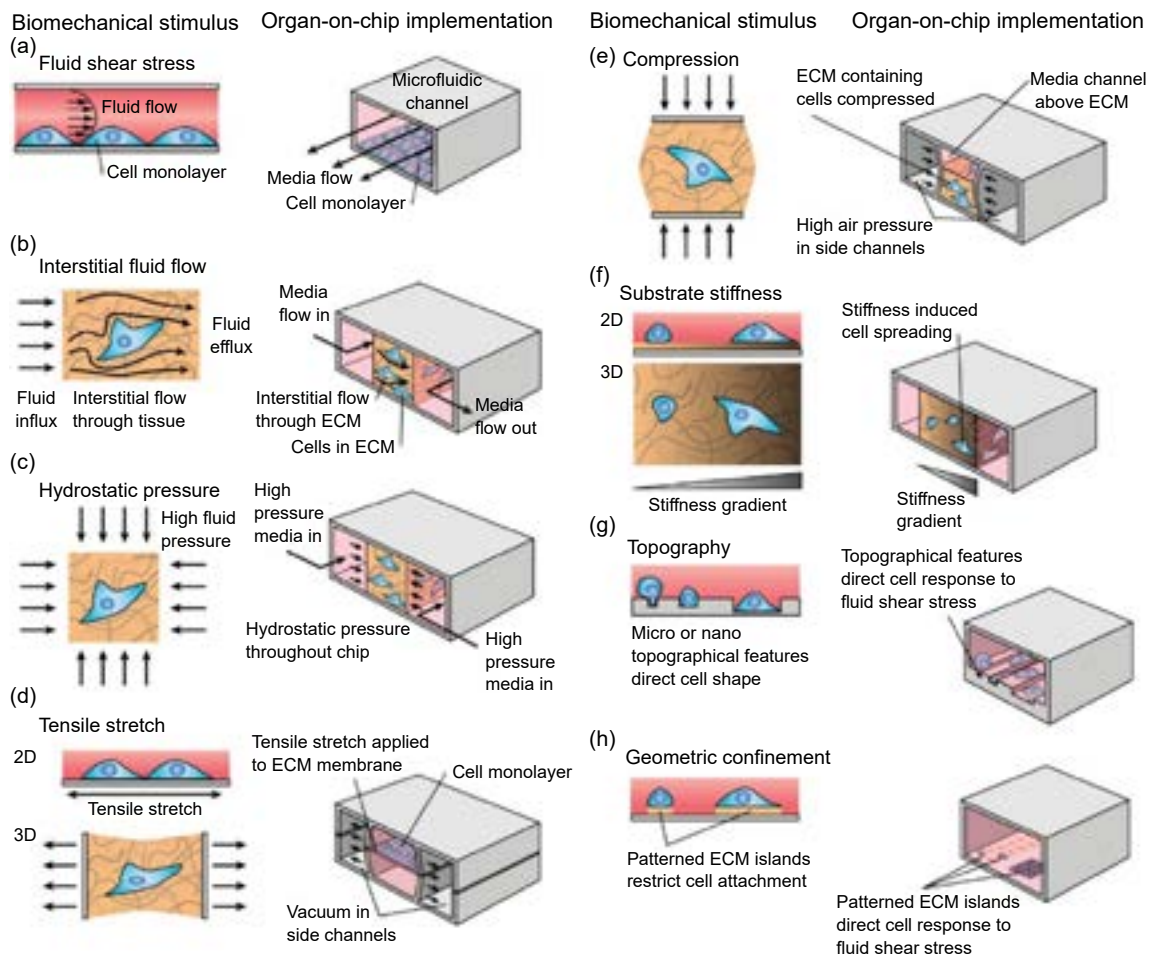


圖 2. FSS 和機械應力對於細胞的獨特影響，其中 (a)-(e) 為外界刺激，分別為 (a) FSS、(b) 血液和組織細胞交換物質所形成之間質流動力、(c) 流體在靜止下所呈現之壓力、(d) 拉伸應力和 (e) 壓縮力。(f)-(h) 為固定刺激，包含 (f) 基質本身之硬度、(g) 奈米或微米之基質表面結構差異和 (h) 基質幾何形狀⁽¹⁰⁾。

4. 常見晶片結構

OoC 尺寸、形狀和流道數量會依據目標器官的種類和結構有所變化 (圖 3)，其中單流道為最簡單之晶片結構，常用於模擬初期毒性測試或藥物篩檢，為相對基本的生理過程，不涉及複雜組織間交互作用。雙層流道可以分為平行和垂直流道，彼此緊靠並以多孔薄膜分開，多孔薄膜除了具有優異的滲透性，能供給細胞和培養基進行營養物質交換，也可以促進細胞間交流⁽¹¹⁾，這種將兩個流道區隔開的特色，很適合被用於不同相之研究⁽¹²⁾，用來重現更為複雜生理機制，全面地模擬器官功能和反應，例如結構和組成都較為複雜的肺、腎臟以及大腦，使能更精確模擬生理系統之微環境，有助深入了解器官中複雜生理過程。

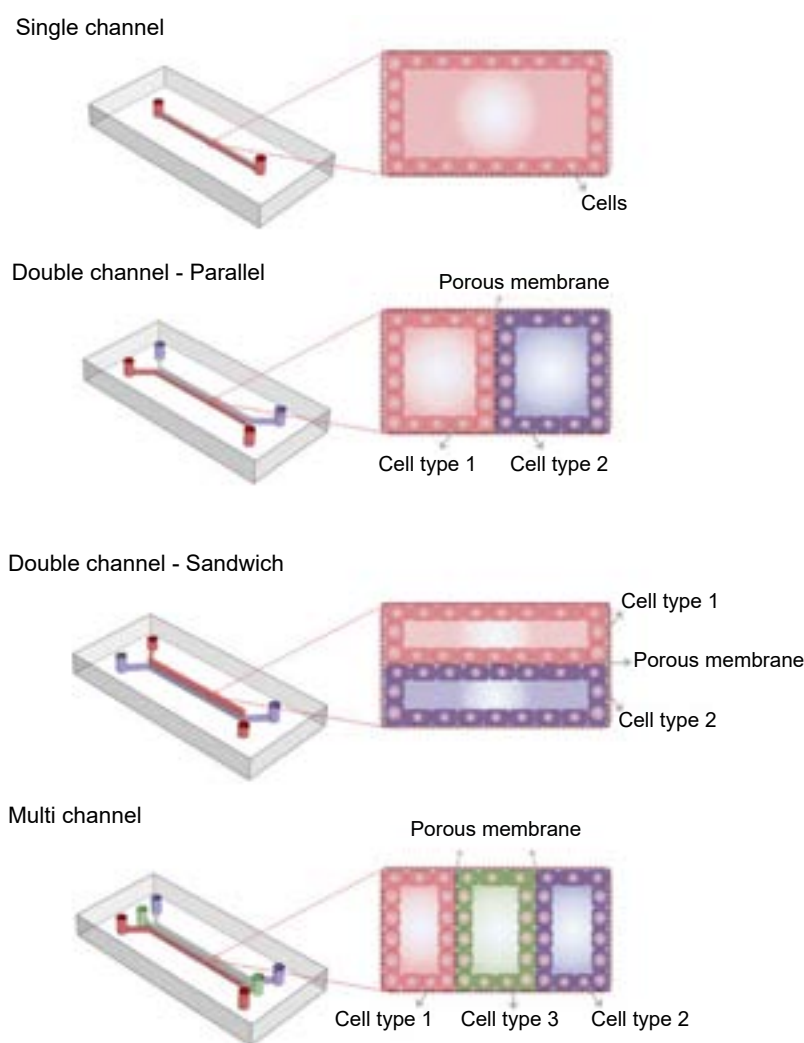


圖 3. 單、雙、三流道組合的 OoC 示意圖⁽¹¹⁾。

5. 肺晶片中的氣液介面環境

相較其它器官，呼吸系統特別是如肺泡中的血液－氣體屏障扮演著關鍵角色，它負責將氧氣從吸入的空氣中擴散到血液，同時排出二氧化碳，在這個過程中，氣液介面 (air-liquid interface, ALI) 就成為了模擬呼吸道微環境的一種方法，而這種特殊的氣液結合環境，

在晶片中 (特別是肺晶片) 可使用雙層通道和多孔性薄膜，就能在體外有效模擬真實的呼吸道條件 (圖 4)。ALI 環境對於肺部仿生至關重要，因為某些細胞表達需要在 ALI 培養環境下才能表現重要生理特徵，例如黏液層 (mucus layer) 以及與其密切相關之黏液纖毛清除行為 (mucociliary clearance)，過往研究也發現，ALI 環境中的組織結構相較於傳統浸沒培養有更優異之效果，同時能重現呼吸道輸送現象，幫助藥物開發時能將藥物以吸入性方式作用於細胞，並精密地控制藥物劑量和試驗條件⁽¹⁴⁾。

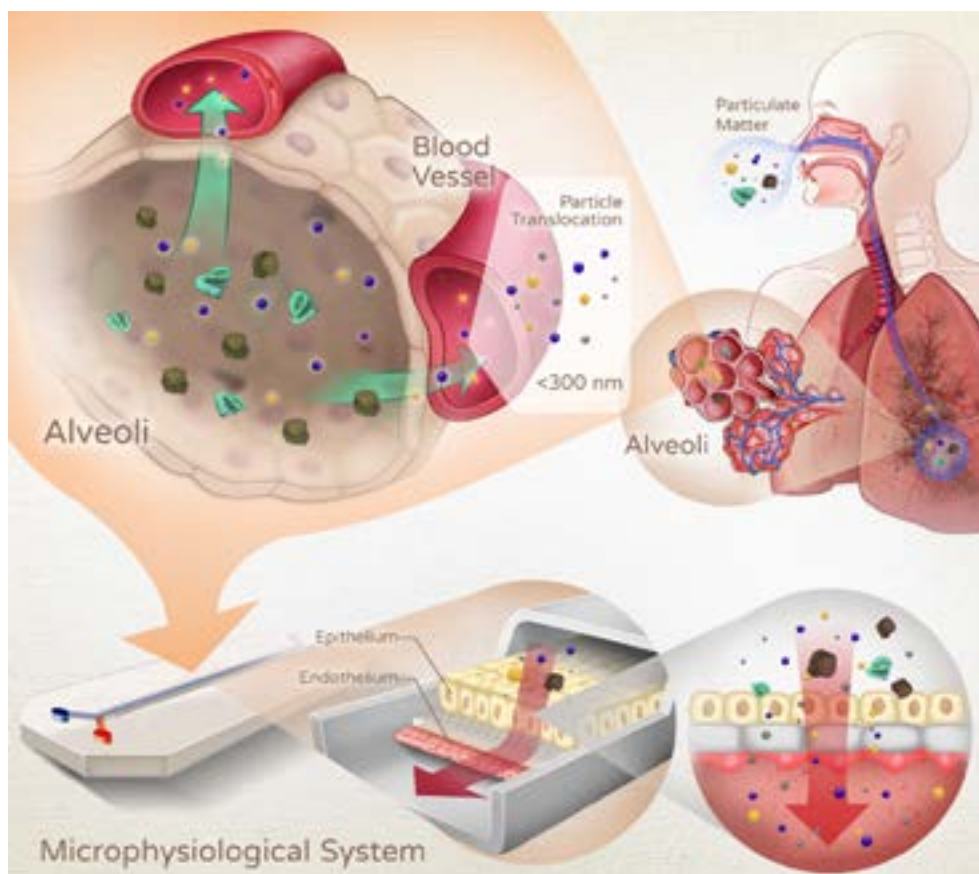


圖 4. 人體肺部中 ALI 環境與 LoC 之雙層結構對照示意圖。可以透過分別在上層流道控制氣體流動，下層流道控制液體流動，並以多孔膜分隔來實現⁽¹³⁾。

三、肺晶片的應用實例

1. 懸浮微粒危害評估

懸浮微粒 (particulate matter, PM) 是泛指懸浮在空氣中的固體顆粒或液滴，其中粒徑小於或等於 $2.5\ \mu\text{m}$ 的 $\text{PM}_{2.5}$ 最具有威脅性，由於極小的體積， $\text{PM}_{2.5}$ 除了會隨人體呼吸深入肺部引起呼吸系統的損傷及發炎反應，還會穿透過肺泡組織進入血液循環系統，增加心血管疾病的風險，甚至有可能引起免疫系統與內分泌系統的異常。儘管過去數十年來臨床研究已提供了大量證據表明 $\text{PM}_{2.5}$ 會對人體健康造成危害，但由於其會通過多種途徑使人體組織產生病變，且組成 $\text{PM}_{2.5}$ 的成分相當複雜，因此對於真正的致病機制仍未有完整解釋⁽¹⁵⁾。

在這樣的背景下，團隊先前成功利用 LoC 技術成功模擬並觀察到 $\text{PM}_{2.5}$ 對人體組織造成的危害⁽¹³⁾，為了解 $\text{PM}_{2.5}$ 的相關機制以提供新的見解，晶片設計上首先透過共培養的方式讓 LoC 同時具有肺上皮組織與血管組織，隨後選用 $\text{PM}_{2.5}$ 中常見的兩種成分－二氧化矽奈米粒子 (SiO_2) 與柴油引擎懸浮微粒 (diesel exhaust particles, DEP)，通過動態暴露的方式將多種粒徑範圍的 PM 遞送至上皮組織，模擬人體吸入 PM 的損傷過程，並透過測定組織的屏障功能與量測 PM 的滲透率進行分析。從實驗結果發現， SiO_2 與 DEP 皆會顯著地造成組織損傷與屏障功能下降，其中直徑 200 nm 以下的 PM 具有更強的組織穿透能力 (圖 5)，而以上結果與過往的臨床研究高度相似，證明了 LoC 在模擬 $\text{PM}_{2.5}$ 對人體健康影響方面的可靠性與潛力。

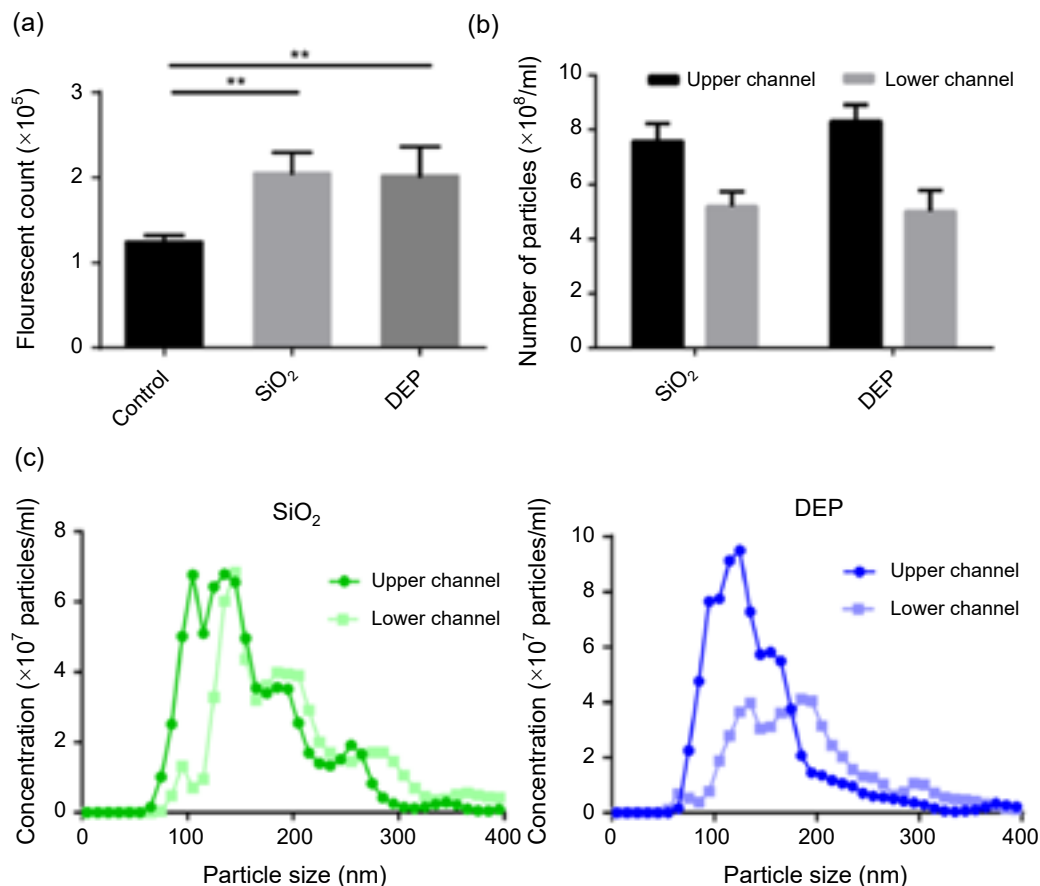


圖5. SiO_2 與 DEP 影響細胞屏障之結果。(a) 經過 SiO_2 與 DEP 的暴露後細胞受到損害，因此與控制組相比細胞屏障效果變差，致使滲透性上升。(b) 以奈米粒子追蹤儀計算上層流道 (未穿透) 與下層流道 (成功穿透) 中的 SiO_2 與 DEP 顆粒數量之比較。(c) SiO_2 與 DEP 顆粒在晶片中的尺寸分布，其中直徑 200 nm 以下的 PM 在下層流道內有最高的穿透比例⁽¹³⁾。

2. 疾病模型建立

在 PM 導致的眾多肺部疾病中，尤以慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 最為常見，COPD 是一種因呼吸道長期發炎，致使呼吸道變狹窄與黏液過度

分泌的疾病，並伴隨咳嗽、疲勞和憂鬱等症狀，病患可能因呼吸困難而影響工作和日常生活，最終因肌肉失調或呼吸道感染出現症狀上的惡性循環。然而，COPD 在臨床上因為沒有客觀的量化指標，以及個體中的病徵差異而難以在早期被測出，並因為難以根治及伴隨的嚴重併發症，容易被誤判而錯估疾病的嚴重程度，往往等到病情加重或失去肺功能才被發現，在目前已位列全球前三大死因⁽¹⁶⁾。

而為理解 COPD 的複雜的致病機制並研究更有效的治療手段，在 LoC 中創建群體的疾病模型即成為關鍵解方^(17, 18)，但技術上除了需維持與人體相似的生理結構外，更重要的是如何更好的重現關鍵肺部疾病特徵與生理變異，如纖毛黏液的分化異常及細胞屏障的損害，值得一提的是，目前臺灣的研發能量已能滿足此需求 (圖 6)，現階段更可在晶片中透過來自健康人和病患的細胞，建立具不同纖毛黏液特徵的 LoC，並藉其病變特徵進行藥物開發的準確評估。

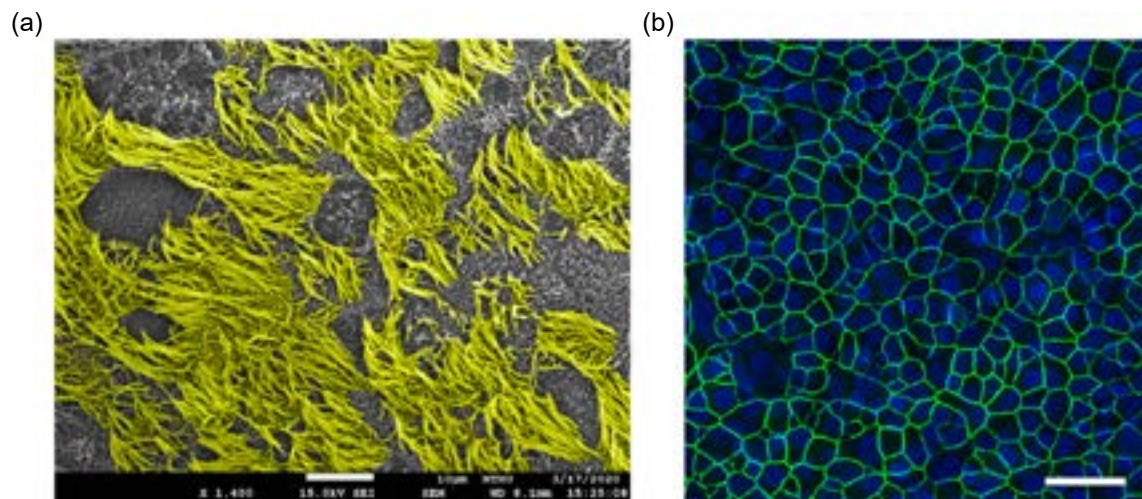


圖 6. 小氣道組織的關鍵生理特徵。(a) 以掃描電子顯微鏡拍攝之纖毛影像。(b) 表現明顯組織屏障之上皮組織層影像，其分別對細胞核 (藍) 與緊密連接蛋白 (綠) 進行螢光染色標記⁽¹⁹⁾。

3. 藥物治療與開發

組織重建的優勢不僅在於幫助理解致病機制，還在研究藥物開發方面具有巨大潛力，團隊過往就曾發現原先用來治療瘧疾的氯喹 (CQ) 與對抗寄生蟲的伊維菌素 (ivermectin, IVM)，在 COPD 具調節潛在致病機制的功效，並顯著改善肺部組織所受之影響 (圖 7)。而除了 COPD 外，在先前 COVID-19 疫情蔓延的背景下，體外仿生技術就對快速了解 SARS-CoV-2 病毒的感染機制、疾病發展及潛在治療策略做出貢獻，許多研究在當時迅速提出完整的病毒感染機制，部分還加入免疫反應模擬，以更完整了解病毒感染全貌^(20, 21)。同時，也有研究在病毒感染模型的基礎上進行了潛在藥物的試驗，如瑞德西韋與阿莫待奎，其中瑞德西韋抑制病毒複製的效果更與人體臨床表現一致^(21, 22)。這些研究都一再突顯了 LoC 在藥物研發領域的重要性，相較於動物模型可以更好的理解人類疾病，並加速對潛在藥物的研發與測試。

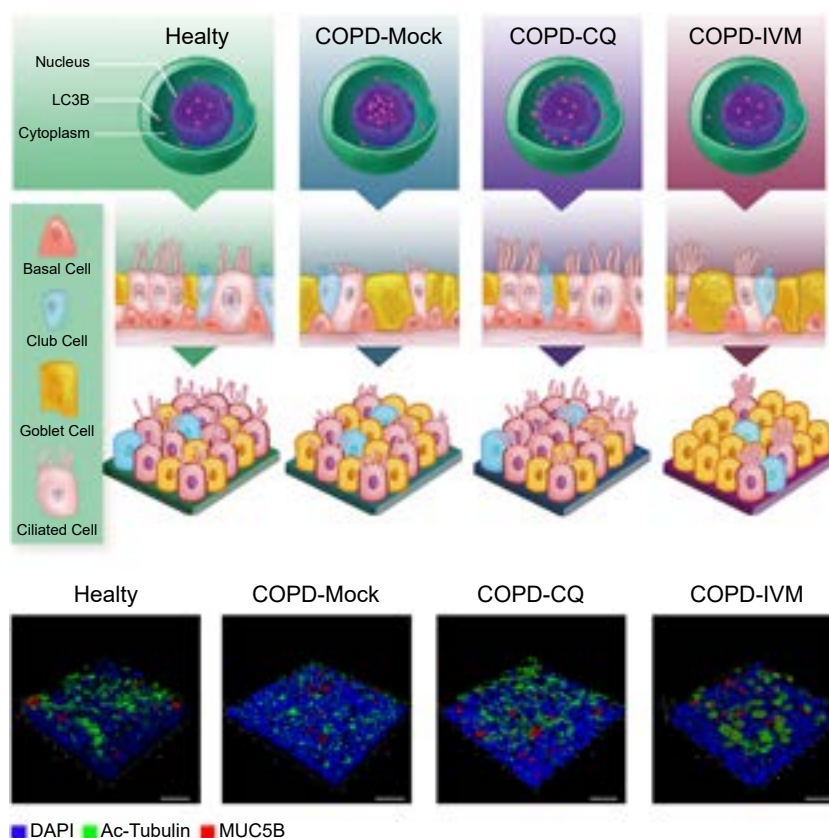


圖 7. 健康細胞、COPD 細胞與經過潛在藥物治療後的細胞之比較示意圖。經 CQ 刺激後可以改善 COPD 細胞的纖毛表現，而使用 IVM 刺激後，COPD 細胞則表現出多纖毛細胞的分化特徵。最下排則分別對細胞核 (藍)、纖毛 (綠) 與黏液 (紅) 進行螢光染色標記。比例尺為 $25\ \mu\text{m}^{(19)}$ 。

四、器官晶片的未來與挑戰

上述的研究表明，OoC 對於了解疾病和探詢潛在療法都有莫大的幫助，能針對單一器官或特定組織功能進行研究，相較於動物實驗能夠提供更接近人體臨床實驗的結果。然而，晶片模型尚無法完全模擬生物體的複雜度，若需要研究多生物系統之間的相互作用，如免疫系統與神經系統之間的調控，仍需要借助動物模型以達到全面的觀察。

此外，OoC 在近年雖已逐漸廣泛發展，但由於組織微環境的複雜性、細胞的來源差異，且各團隊在開發過程中缺少標準操作規範，使不同晶片在實驗結果較難有一致的基準參考，難以互相比對，因此將 OoC 大規模的投入藥物研發前，需建立完善的標準化流程，才可確保各晶片的實驗結果具參考性和再現性，推動 OoC 技術進一步的落地與應用。

而在追求仿生模型的過程中，也需發展相對應的新型分析方法，現行晶片中的數據分析方法仍依賴大型精密儀器、繁瑣操作與多次迭代，導致實驗過程相當費時，而且經過傳統的終點式分析後細胞通常即失去活性，然而臨床研究中非常需要人體健康變化的連續追蹤。因此，如何提升 OoC 的實驗吞吐量，並達到對細胞微生理訊號的靈敏、連續且即時量測，將很大程度決定晶片在臨床前研究可發揮的價值。

雖然歐美在器官晶片的發展領先臺灣多年，但近年隨著微機電系統技術的進步，在晶片中整合穩定、高靈敏度的感測工具將更有價值，而臺灣有著領先全球的資通電技術與半導體產業鏈，若能在這樣的基礎上進行整合，將可有效改善上述侷限。值得一提的是，團隊從2022年即啟動「器官晶片 3.0」的次世代開發計畫，期許透過 Bio-ICT 的技術導入，加速消除 OoC 上真實疾病情形和模擬結果之間的差異，從而提高疾病診斷和藥物開發之準確度，替未來藥物試驗提供更可靠的數據支持，相信整合半導體跟臨床醫學的優勢，這項技術在全球競爭上，臺灣的彎道超車將不會只是口號，而是不久就會看到的光景。

參考文獻

1. IQVIA Institute. Global Trends in R&D 2024 (IQVIA Institute, 2024).
2. Van Norman, G. A., *JACC: Basic to Translational Science*, **4** (7), 845 (2019).
3. Ingber, D. E., *Nature Reviews Genetics*, **23** (8), 467 (2022).
4. Leung, C. M., De Haan, P., Ronaldson-Bouchard, K., Kim, G. A., Ko, J., Rho, H. S., ... & Toh, Y. C., *Nature Reviews Methods Primers*, **2** (1), 33 (2022).
5. Nahak, B. K., Mishra, A., Preetam, S., & Tiwari, A., *ACS applied bio materials*, **5** (8), 3576 (2022).
6. Kutluk, H., Bastounis, E. E., & Constantinou, I., *Advanced Healthcare Materials*, **12** (20), 2203256 (2023).
7. Kutluk, H., Bastounis, E. E., & Constantinou, I., *Advanced Healthcare Materials*, **12** (20), 2203256 (2023).
8. Dufva, M., *Scientific Reports*, **13** (1), 8233 (2023).
9. Corral-Nájera, K., Chauhan, G., Serna-Saldivar, S. O., Martinez-Chapa, S. O., & Aeinehvand, M. M., *Microsystems & Nanoengineering*, **9** (1), 107 (2023).
10. Thompson, C. L., Fu, S., Heywood, H. K., Knight, M. M., & Thorpe, S. D., *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, **8**, 602646 (2020).
11. Tajeddin, A., & Mustafaoglu, N., *Micromachines*, **12** (12), 1443 (2021).
12. Huh, D., Matthews, B. D., Mammoto, A., Montoya-Zavala, M., Hsin, H. Y., & Ingber, D. E., *Science*, **328** (5986), 1662 (2010).
13. Lin, K. C., Yang, J. W., Ho, P. Y., Yen, C. Z., Huang, H. W., Lin, H. Y., ... & Chen, G. Y., *Applied Materials Today*, **26**, 101281 (2022).
14. Bennet, T. J., Randhawa, A., Hua, J., & Cheung, K. C., *Cells*, **10** (7), 1602 (2021).
15. Thangavel, P., Park, D., & Lee, Y. C., *International journal of environmental research and public health*, **19** (12), 7511 (2022).
16. Vogelmeier, C. F., Roman-Rodriguez, M., Singh, D., Han, M. K., Rodriguez-Roisin, R., & Ferguson, G. T., *Respiratory medicine*, **166**, 105938 (2020).
17. Benam, K. H., Villenave, R., Lucchesi, C., Varone, A., Hubeau, C., Lee, H. H., ... & Ingber, D. E. Small airway-on-a-chip enables analysis of human lung inflammation and drug responses in vitro. *Nature methods*, **13** (2), 151 (2016).
18. Benam, K. H., Novak, R., Nawroth, J., Hirano-Kobayashi, M., Ferrante, T. C., Choe, Y., ... & Ingber, D. E., *Cell systems*, **3** (5), 456 (2016).
19. Chen, S. L., Chou, H. C., Lin, K. C., Yang, J. W., Xie, R. H., Chen, C. Y., ... & Chen, G. Y., *Materials Today Bio*, **13**, 100182 (2022).
20. Yang, J. W., Lin, Y. R., Chu, Y. L., Chung, J. H., Lu, H. E., & Chen, G. Y., *Communications Biology*, **5** (1), 70 (2022).
21. Si, L., Bai, H., Rodas, M., Cao, W., Oh, C. Y., Jiang, A., ... & Ingber, D. E., *Nature biomedical engineering*, **5** (8), 815 (2021).
22. Zhang, M., Wang, P., Luo, R., Wang, Y., Li, Z., Guo, Y., ... & Qin, J., *Advanced Science*, **8** (3), 2002928 (2021).

作者簡介

陳冠宇先生為國立清華大學化學工程研究所博士，現為國立陽明交通大學生物醫學工程研究所教授。

Guan-Yu Chen received his Ph.D. in the Department of Chemical Engineering from National Tsing Hua University. He is currently a Professor at the Institute of Biomedical Engineering, College of Electrical and Computer Engineering, National Yang Ming Chiao Tung University.

石昂東先生現為國立陽明交通大學生醫工程研究所碩士班研究生。

Ang-Tung Shih is currently an M.S. student at the Institute of Biomedical Engineering, College of Electrical and Computer Engineering, National Yang Ming Chiao Tung University.

李珊宣小姐現為國立陽明交通大學生醫工程研究所碩士班研究生。

Shan-Hsuan Li is currently an M.S. student at the Institute of Biomedical Engineering, College of Electrical and Computer Engineering, National Yang Ming Chiao Tung University.

藥物與免疫反應篩選之腫瘤微環境晶片開發

Tumor Microenvironments on a Chip for Drug and Immune-response Screening

胡尚秀、江銘仁、邱凱雯

Shang-Hsiu Hu, Min-Ren Chiang, Hoi Man Iao

根據美國國家癌症研究所 (NCI) 的新統計研究顯示，未來 30 年美國老年人口罹患癌症的數量將大幅增加。預估到 2040 年，美國癌症患者數量將增加 1100 萬，從目前的 61% 上升至 73%，形成未來 30 年的「癌症銀海嘯」。臺灣同樣正面臨人口老齡化的挑戰，預料罹癌人數將急速上升。根據衛生福利部統計，臺灣罹癌死亡率接近 30%，是國人十大死因之首。儘管許多研究人員致力於開發有效的藥物傳遞系統以提高治癒率並降低化療副作用，但成效仍然有限。主要原因在於腫瘤微環境的複雜性，導致體外藥物篩選時存在誤差，進而造成許多臨床藥物測試失敗。為了實現精準模擬腫瘤微環境的目標，許多研究開發了模擬腫瘤微環境晶片 (tumor microenvironment on a Chip, TMoC)。這些晶片可用於快速篩選和評估藥物載體系統在腫瘤中的穿透性，並評估化學藥物和免疫治療的特性，以了解腫瘤微環境對藥物和免疫治療的影響。TMoC 包含數百顆三維腫瘤細胞，包括血管、纖維母細胞、癌細胞、癌幹細胞和巨噬細胞，並且可以及時評估藥物載體的穿透和治療效果，觀察各種細胞之間的相互作用，並評估在 T 細胞作用下整體細胞的變化。

According to a new statistical study published by the National Cancer Institute (NCI), the number of cancers in older adults in the United States will increase significantly in the next 30 years. It is estimated that the number of cancer patients in the United States will increase by 11 million in 2040 (from 61% to 73%), will be the cancer silver tsunami in the next 30 years. Taiwan's aging society will also lead to a rapid increase in the number of cancer cases. According to statistics from the Ministry of Health and Welfare, Taiwan's cancer mortality rate is close to 30%, ranking first among the top ten causes of death in the country. Although many researchers are committed to developing effective drug delivery systems to improve cure rates and reduce chemotherapy side effects, the results are still limited, mainly due to the complexity of the tumor microenvironment, which results in errors in in vitro drug screening and causes many clinical problems. In order to achieve the purpose of accurately simulating the tumor microenvironment in vitro, many research concepts are to develop tumor microenvironment on a chip (TMoC), which can be used to quickly screen and evaluate the penetration of drug carrier systems into tumors, and screen Characteristics of chemical drugs and immunotherapy, and understanding the impact of tumor microenvironment

on drugs and immunotherapy. The TMOc contains more than hundreds of three-dimensional tumors (including blood vessels, fibroblasts, cancer cells, cancer stem cells, and macrophages). The penetration and therapeutic effect of the drug carrier can be evaluated in a timely manner, and the correlation between each cell can be observed and assess overall cellular changes under the influence of T cells.

一、癌症銀海嘯來襲

「癌症可望全面治癒！」這樣的報導幾乎每年都會出現在新聞上。在 1970 年代，美國總統尼克森簽署施行國家癌症法，投入大量預算以期徹底研究癌症治療。然而，經過了 45 年，臨床上確實增加了上百種癌症藥物，包括傳統化療藥物、標靶藥物、單株抗體等等。癌症的存活率和存活時間也隨之提升。然而，2016 年美國國家癌症研究所 (National Cancer Institute, NCI) 發表的新統計研究指出，未來 30 年美國罹癌人數將大幅增加，特別是 65 歲及以上的癌症人數。預估到 2040 年，美國癌症患者數量將增加 1100 萬，從 2016 年的 1550 萬增加到 2040 年的 2610 萬。這將是未來 30 年的「癌症銀海嘯」^(1, 2)，在醫療與照護上需要警慎面對的議題。這些數字顯示，儘管當今的癌症診斷技術不斷提升，新藥不斷推出，仍無法阻止這一波癌症銀海嘯的來襲。目前，根據衛生福利部統計，臺灣每年新增罹癌人數超過 14 萬人，死亡率接近 30%，是國人十大死因之首。

許多研究人員致力於開發有效的藥物傳遞系統，以提升治癒率和降低化療副作用，但成效仍然有限。主要原因在於腫瘤本身具有極大的變異性。就算在臨床上定義為同一種腫瘤，其中的差異性也相當大。因此，同一種治療對不同腫瘤的效果會有明顯差異，造成許多臨床藥物測試的失敗。

問題所在正是腫瘤的微環境 (tumor microenvironment, TME) 的複雜度和個體差異。一般免疫治療藥物開發初期，通常只利用單純的癌細胞作為藥物和治療的模型。然而，腫瘤並非僅由癌細胞構成。腫瘤中還存在許多正常的原組織細胞、纖維母細胞、血管、免疫細胞等，錯綜複雜地交錯在一起。此外，腫瘤內的癌細胞本身也具有多種特性。例如，靠近腫瘤外側的癌細胞因為營養豐富，生長複製速度較快，而腫瘤內部的癌細胞則生長較慢，且可能因缺氧和營養不足而表現不同^(3, 4)。並且，癌細胞可能產生新的突變，導致抗藥性和差異性。在腫瘤微環境中，許多化療藥物必須與氧反應，以破壞癌細胞結構。然而，在腫瘤內部缺氧的環境中，這些藥物的作用受限⁽⁵⁻⁷⁾。而化療藥物通常透過多種機制毒殺腫瘤細胞。這些機制包括直接或間接損傷 DNA、抑制微管、阻止 DNA 或 RNA 合成、調控細胞週期以及抑制腫瘤血管新生等。不同的藥物擁有不同的作用機制，這取決於藥物的類型和腫瘤的生物學特徵。因此，會根據腫瘤的類型、期程和患者的個體情況，選擇最適合的化療藥物。大部分化療藥物雖然對外圍快速複製的細胞有效，但相對較無法影響腫瘤內部已停止複製的細胞，從而使癌症有復發的風險^(8, 9)。此外，標靶藥物雖可精確鎖定特定癌細胞，但僅對特定類型的癌細胞有效，對於發生其他突變的癌細胞則束手無策。最後，藥物破壞癌細胞後可能產生各種細胞碎片，促使周邊正常細胞釋放促進發炎和壓力反應的因子，有時可能影響藥效。

腫瘤微環境是指腫瘤細胞周圍的組織和細胞，包括血管、免疫細胞、間質細胞等，以及這些成分之間的相互作用。腫瘤微環境對於腫瘤的發展、生長和轉移至關重要^(10, 11)。它可

以提供腫瘤細胞生存和增殖所需的營養和生長因子，同時還能影響免疫細胞的活性，從而影響免疫系統對腫瘤的反應。腫瘤藥物治療通常會影響腫瘤微環境⁽¹²⁾。例如，化療藥物可以直接殺死腫瘤細胞，同時也可能影響到腫瘤微環境中的其他細胞，例如血管內皮細胞或免疫細胞。然而，真實腫瘤微環境和研究中模擬的腫瘤微環境之間存在一些差異。在體外或動物模型中研究時，難以完全模擬人體腫瘤微環境的複雜性。此外，不同類型的腫瘤微環境可能對同一種藥物產生不同的反應，這增加了研究和治療的挑戰性。因此，要更好地理解 and 應對腫瘤微環境對藥物治療的影響，需要進一步的研究和臨床實踐。

二、免疫治療的限制

除了上述複雜度外，癌細胞擁有許多掩蔽和防禦機制。例如，它們可以偽裝成正常細胞、表現可抑制免疫細胞攻擊的配體 (ligand)，釋放細胞激素來壓抑免疫反應，躲藏在正常的纖維母細胞或組織細胞之中，或者產生新的突變以削弱抗癌藥物的效果。而腫瘤微環境提供了癌細胞生存、生長和轉移所需的支持，同時也是癌細胞逃避免疫系統攻擊的重要場所。例如，癌細胞可以通過偽裝成正常細胞或躲藏在正常組織細胞之中，來避免免疫系統的識別和攻擊。此外，腫瘤微環境中的免疫抑制細胞和分子，如腫瘤相關巨噬細胞和 T 細胞表面的免疫檢查點分子，也可以被癌細胞利用來抑制免疫反應。這些相互作用使得腫瘤微環境成為癌症發展和治療中的關鍵因素⁽¹³⁾。在了解腫瘤微環境的挑戰之後，就不難理解為什麼過去的抗癌藥物難以逆轉戰局，甚至可能會對各種治療在如此艱困的條件下仍能發揮一定作用感到驚訝。然而，隨著現代免疫療法 and 化療藥物的開發，出現了曙光與契機。免疫療法 (cancer immunotherapy) 利用身體自身的免疫細胞攻擊癌症，因此可能避開傳統化療和標靶藥物在腫瘤微環境中受到的限制。若能與抗癌藥物進行協同治療，將有機會大幅提升治療效果⁽¹⁴⁻¹⁷⁾。

腫瘤微環境的主要特徵是會強力抑制免疫反應，使免疫細胞無法發現並攻擊癌細胞。免疫療法中的免疫檢查點抑制劑 (checkpoint inhibitors)，如鎖定 CTLA-4 分子的 ipilimumab、鎖定 PD-1 分子的 nivolumab 和 pembrolizumab、以及鎖定 PD-L1 分子的 atezolizumab，能夠解除腫瘤微環境對免疫系統的抑制作用，讓體內和腫瘤內的免疫細胞能夠對抗癌細胞⁽¹⁸⁻²⁰⁾。目前的臨床結果顯示，這些免疫檢查點抑制劑對非小細胞肺癌、轉移性黑色素瘤、淋巴瘤、腎細胞癌、膀胱癌和攝護腺癌等癌症有極佳的效果，甚至能夠使部分末期癌症患者完全康復。儘管新的療法推陳出新，每當進行新的測試皆要損耗大量的時間與人力，特別是針對動物實驗，需要投入的資金與時間更為龐大，如能夠開發一種可以進行模擬體內腫瘤微環境與評估免疫治療的系統，期盼將對全世界相關研究帶來巨大幫助，降低龐大動物實驗與節省時間外，更可以直接觀察圍觀腫瘤結構的變化，評估免疫治療與藥物所帶來的影響，甚至評估細胞間的作用。因此，在精準醫療上之精準模擬腫瘤微環境晶片 (tumor microenvironment on a Chip, TMoC)，其可用於快速篩選與評估藥物載體系統於腫瘤的穿透性，並篩選治療藥物結合免疫治療之特性，直接觀察腫瘤微環境對藥物與免疫治療的影響，為世界首創之體外晶片系統^(21, 22)。該 TMoC 內含三維腫瘤 (包含血管、纖維母細胞、癌細胞、癌幹細胞與巨噬細胞)⁽²³⁾，及時評估藥物載體的穿透與治療效果，觀察各細胞之間的關聯性，抑或評估在 T 細胞作用下整體細胞的變化。

三、三維腫瘤為環境建構之目的

近年在藥物傳遞劑型與免疫療法的蓬勃發展，在腫瘤治療上也有重大的進展，藥物傳遞系統包括結合標靶治療、即時診斷、免疫療法等都有大量的研究突破。然而，科學家發現對於動物個體差異或病原體組織變異性，藥物載體系統的代謝或是累積會有不同的行為，導致藥物治療效果有極大的差異，這將是未來必須面臨的問題。克服這個問題需要更好地了解血液載體如何進入其目標組織並在細胞均勻分布^(24, 25)。體內動物模型可用於評估一般藥物動力學，但不可能評估腫瘤組織運輸與血液清除率、血管通透性、組織清除率和淋巴引流。動物研究也受到全動物成像技術的有限分辨率。因此，針對這個議題，研究人員利用三維多細胞腫瘤球狀體 (multicellular tumor spheroid, MCTS) 系統評估載體與細胞的作用，對載體－細胞相互作用的了解主要來自體外細胞單層實驗，了解腫瘤結構對於藥物載體與藥物的影響。這些研究可以評估藥物與細胞腫瘤球的結合行為、親和力與攝取特性等等，也可評估細胞反應和毒性。然而，過去的 MCTS 缺乏三維組織結構和與動物體內動態流動，造成與實際體內狀況不同，因此發展具類似組織流動性的系統對模擬腫瘤微環境相當重要^(26, 27)。

為了達到個人化精準醫療的目的，針對不同的個體腫瘤治療如能針對其變異性達到精準治療的目的，勢必帶來巨大的醫療進步，然而目前臨床的治療體系與技術依然差臨門一腳去完成這項個人腫瘤精準化治療的目標，如上述的三微腫瘤模型，如能針對病患的個體進行體外藥物的快篩，能夠快速找到最佳化藥物治療，期望能夠對癌症的抑制或是存活率能大幅的提升。因此，找尋一個好的體外模型進行藥物測試相當重要，優良的測試系統能夠更貼近真實腫瘤環境。傳統上，單層細胞培養用作體外模型來研究腫瘤行為並鑑定有效的抗腫瘤療法，然而，其由於不能複製細胞駐留在腫瘤組織中的細胞外微環境，在動物研究或臨床試驗中，二維 (2-D) 單層培養中觀察到的治療效果通常不易於動物體內實踐。因此，強大需求在於細胞培養模型的發展幫助彌補常規單層細胞研究和動物實驗之間的差距。近年，三維 (3-D) 多細胞腫瘤球狀體 (multicellular tumor spheroid, MCTS) 模型為體外鑑定潛在抗癌藥物靶點提供了新的契機與突破。與常規細胞單層相比，MCTS 的異質結構與體內實體瘤更為相似。通過外部周圍快速增殖細胞、中間存活細胞、靜止生長細胞和中心壞死核心組織形成大的 MCTS (直徑 > 200 μm) (圖 1)^(28, 29)。

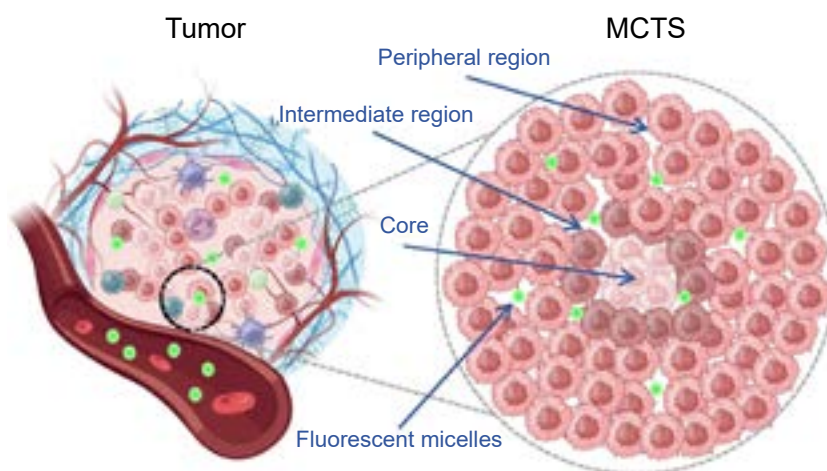


圖 1. 三維 (3-D) 多細胞腫瘤球狀體 (MCTS) 模型為體外評估潛在抗癌藥物靶點提供新的契機。

此外，與體內腫瘤類似的廣泛的細胞和細胞－細胞外基質相互作用，促進了生物自主性的恢復功能。細胞間和細胞外間質伴隨著間質壓力的升高，也為藥物擴散提供了有助於耐藥性的物理屏障。因此，MCTS 可以為抗癌藥物測試提供有價值的 3-D 體外微量腫瘤模型，其可以在模擬無血管性腫瘤結節時更具預測性和更精確性。已經開發了各種技術來產生 MCTS 中，傳統使用具有非黏附表面的塑料培養皿或旋轉細胞培養系統形成球體。這些培養系統允許單細胞自組裝，並最終形成多細胞聚集體。然而，傳統的研究方法會導致腫瘤球體大小與均勻度較差，而近期開發之懸滴培養，雖然可以克服這個問題，但是將各個球體的均勻分隔或是大規模生產制被則依然無法達到。因此，發展高度穩定與可以量化的腫瘤微球系統更顯微相當重要。

四、腫瘤為環境微流道運用在藥物與免疫篩選

利用微流道系統 (microfluid) 裝置作為可控制體外腫瘤平台更具突破性，其可控腫瘤球外部的流量條件，評估使用微量試劑於複雜細胞結構的影像，貼近腫瘤體內行為。最近，新發展的微流道系統已經可用於培養細胞、產生組織微環境、模擬器官、或離體評估器官組織⁽³⁰⁻³²⁾。然而，大部分的研究依然沒有提供關於分子或藥物傳遞系統 (載體) 在通過腫瘤組織的行為，評估其物理與化學性質的影響⁽³³⁾。雖然當今微流道系統設計可用於模擬腫瘤系統和分析藥物機轉，但是還沒有使用動物模型進行驗證，因此難以評估這些微流道裝置用於預測體內結果的準確性。雖然這類的研究將微流道作為快速和具有成本效益的藥物預測及篩選，但模擬體內腫瘤系統的最佳微流道設計仍不清楚，如果能突破此限制，相信對未來的研究相當有意義。舉例來說，藥物載體大小、形狀和表面化學能影響腫瘤的積累，然而，載體於腫瘤內的動力學與腫瘤內間質流速的行為依然尚未明確，對微流道系統的設計將是一大挑戰。因此，科學家在微流道腫瘤晶片上模擬在流動狀態下的腫瘤對載體作用的行為分析，在微流道上放置一顆腫瘤球，在利用不同微流道控制不同流速通入載體，研究發現當載體小於 110 nm 時，腫瘤更容易累積載體，並不會受到液體循環而消失^(34, 35)。此外，在控制不同流速的同時，並不會增加載體的在腫瘤球累積，只會增加周邊組織的累積，然而要進行腫瘤穿透時，必須要有更小的載體。這個研究第一次利用微流道系統評估載體對腫瘤穿透的影響，然而，要達到轉譯醫學腫瘤微流道晶片的目標與個人化精準治療則需要有更多的統計數據，更易使用的系統，並進行全方位的評估才更具未來的前瞻性。

除了提升腫瘤的累積之外，針對藥物／載體於腫瘤的穿透性也是一個重要的議題，唯有進入腫瘤深層組織中，才有機會有效毒殺癌細胞。然而，頑強的腫瘤卻還是有面相當緻密的屏蔽，許多文獻指出，藉由主動、被動標靶，累積效果呈現後，卻發現藥物的累積都是於新生血管附近，藥物根本無法穿透緻密的細胞外間質並深入腫瘤內部進行治療⁽³⁵⁻³⁷⁾，而此微流道系統則提供非常良好的篩選目的。舉例來說，目前臨床上利用奈米藥物輸送系統治療腫瘤，可藉由腫瘤血管通透效應達到累積效果，然而奈米藥物載體於腫瘤的穿透能力依然有限，無法直接進入腫瘤深部的位置，造成於腫瘤局部無法到達藥物有效濃度。去年，*Nature Review Materials* 的一篇研究統整了近 10 年奈米藥物對於腫瘤累積的狀況，作者分析了近兩萬篇關於奈米藥物累積於腫瘤的學術文獻，發現到平均只有 0.7%ID 的劑量 (% injected dose) 累積在腫瘤位置，對於奈米藥物的發展來說，提升累積的效果是相當低的，在文中提到，雖然大部分奈米劑型可以累積於腫瘤位置，不過由於身體的循環代謝，很快的將載體清除，更

重要的是，腫瘤所帶來的自然屏蔽 (如腫瘤間質液壓力與腫瘤周圍高密度纖維細胞)，讓載體無法穿透腫瘤深處，造成累積效果有限，因此藥物設計勢必要加入主動且專一性的標靶功能與提升載體／藥物於腫瘤的穿透，來達到更有效的藥物治療⁽³⁸⁾。

五、不同階段微流道與腫瘤微環境設計

在微流道上可建構不同的腫瘤微環境，兩個部分可以進行探討 (圖 2)：(1) 模擬腫瘤微環境晶片：應用於快速篩選與評估藥物載體系統於腫瘤的穿透性，並篩選化學藥物與免疫治療的特性，了解腫瘤微環境對藥物與免疫治療的影響。(2) 主動型腫瘤穿透載體 (active tumor-penetration) 與協同免疫療法，其中包含外泌體 (exosomes)、酸鹼應答性樹枝狀聚合物及抗癌藥物或是細胞免疫檢查點抑制劑等療效評估。在 TMoC 上，利用 3D 列印技術製備多層結構，並在單一晶片上放置高通量三維腫瘤，該腫瘤球除了有腫瘤細胞外，也包含血管、纖維母細胞、癌細胞、癌幹細胞與巨噬細胞，在 TMoC 可以利用 3D 列印技術的多變性調控腫瘤大小，並配合流道設計與調整流速，更精準模擬腫瘤微環境。在晶片上，也可利用高精度之三維腫瘤掃描系統，建立腫瘤形態對藥物治療的數據系統，可利用免疫螢光染色評估細胞間作用、細胞凋亡、細胞死活與光鉗評估腫瘤球機械強度等。

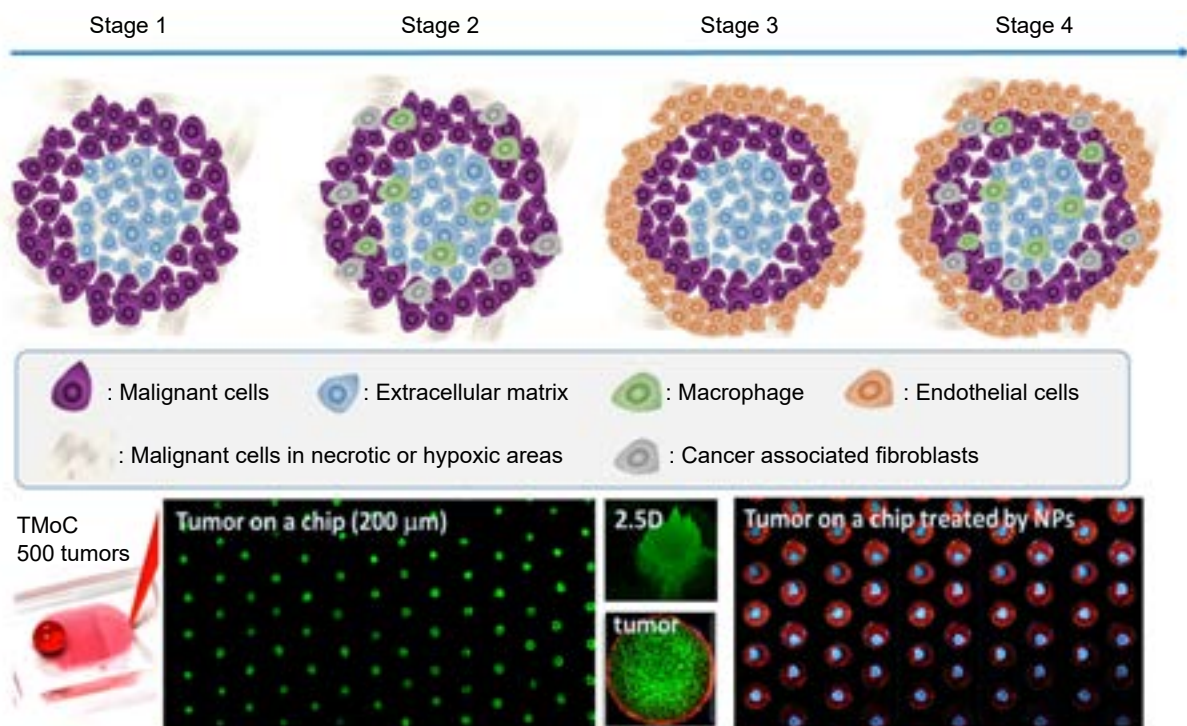


圖 2. 模擬腫瘤微環境晶片 (TMoC)：第一階段，先利用不同癌細胞建構腫瘤微球在晶片上，此類型在腫瘤周圍可以形成緻密細胞骨架；第二階段則會加入腫瘤纖維細胞 (cancer associated fibroblast) 與巨噬細胞進一步模擬腫瘤環境。第三階段將嘗試將血管上皮細胞 (endothelial cells) 建構於腫瘤微球周圍，該結構可以評估藥物與載體通過血管的情形；第四階段期待接先前所建構的部分整合，並利用流道設計，在腫瘤生成後通入不同的免疫細胞。
(下排) 在先前技術上，已將病患大腸癌細胞培養與晶片系統上。

六、建構其他其他技術與微流道藥物篩選

建立高通量 TMoC 所帶來的檢測優勢在於可以利用快速利用光學系統達到數項目的：

(1) 利用各項抗體與染色技術達到多重特性評估；(2) 精準觀測細胞／細胞的關係；(3) 了解載體與藥物的滲透情況；(4) 快速掃描與建立龐大資料庫；(5) 重建三維影像系統與 (6) 新型光學檢測技術開發。在多項的技術協助下，載體與藥物對於腫瘤球細胞的關係更能夠掌控，如圖 3 所示，載體可藉由不同流速通入 TMoC，模擬腫瘤微環境，隨後在不同時間點可觀察載體、藥物與細胞間的作用，藉由細胞核與肌動蛋白絲 (filamentous action, F-actin) 的染色可建立三微腫瘤模型，藉以觀察藥物／載體穿透特性，並且長時間追蹤建立穿透動力學 (kinetics) 與藥物分佈，也可利用共軛焦 (confocal) 掃描了解在各個縱切深度的藥物／載體分部，對於載體穿透腫瘤 (penetration) 研究相當有幫助；另外，在藥物作用後，可以直接於 TMoC 上評估細胞的存活率，藉由快速掃描技術與統計，建立可靠的藥物作用指標，在化療藥物作用下，評估細胞凋亡情況；另外，在外界刺激作用下 (如光、聲與磁)，可以建立細胞的形變情況，評估細胞微球所受到的影響，抑或評估癌細胞是否脫離腫瘤造成轉移的可能性。

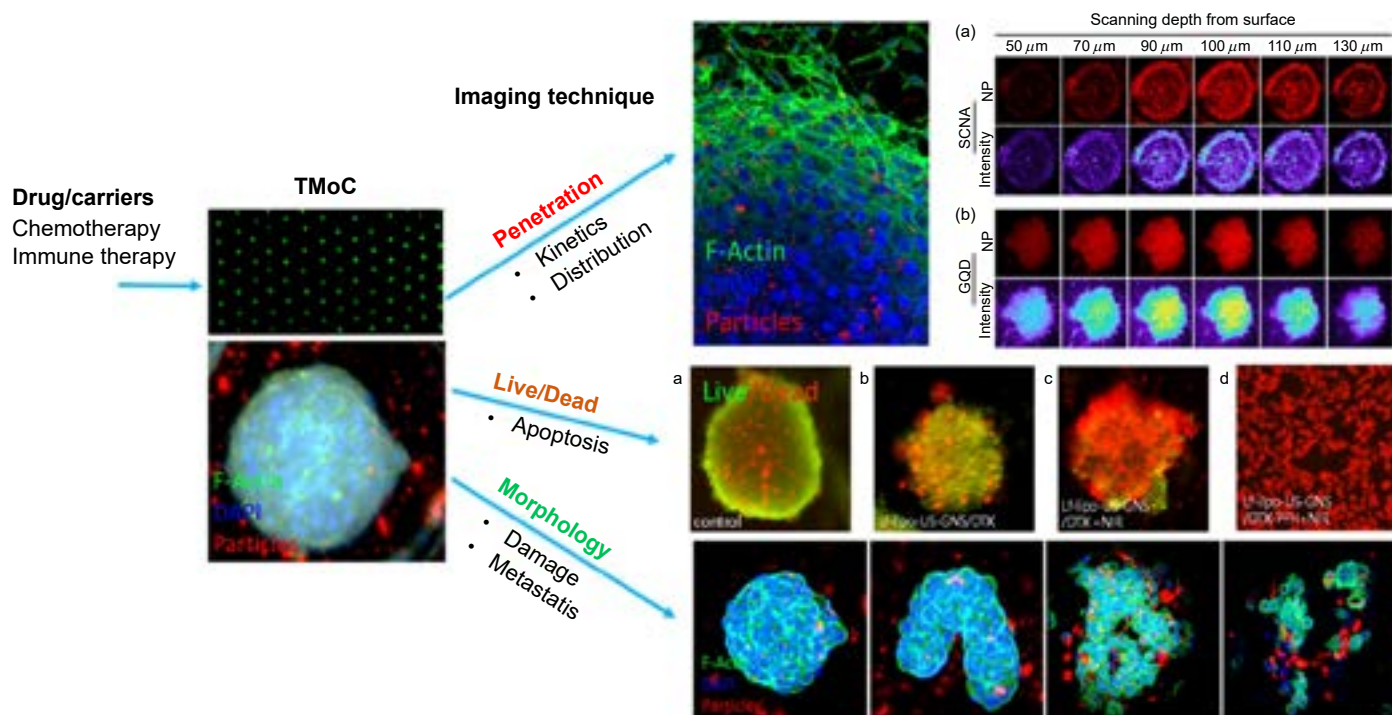


圖 3. 高通量 TMoC 可達目的：(1) 利用各項抗體與染色技術達到多重特性評估；(2) 精準觀測細胞／細胞的關係；(3) 了解載體與藥物的滲透情況；(4) 快速掃描與建立龐大資料庫；(5) 重建三維影像系統與 (6) 新型光學檢測技術開發。

七、結論

新藥開發耗費大量時間與金錢，往往超過 10 億美元，且每 1 萬個新藥研發計畫僅有 5 個能成功上市。因此，新劑型新藥成為應對之道，而腫瘤微環境藥物篩選開發的平台具有卓

越的潛力。這種平台利用微流道技術，模擬腫瘤微環境的生理條件，包括細胞間的交互作用和局部化學環境，從而更準確地評估藥物的效果和安全性。透過腫瘤微環境藥物篩選開發，研究人員可以更有效地篩選出對腫瘤微環境具有特定效應的候選藥物，並加速這些藥物的開發和上市過程。因此，微流道藥物篩選開發平台與腫瘤微環境晶片的結合，為癌症治療的個性化和精準化提供了新的途徑和可能性。新劑型的開發經費較低，且可縮短開發時程，因此有望為國家帶來新的新藥開發契機。

參考文獻

1. L. Rahib, M. R. Wehner, L. M. Matrisian, and K. T. Nead, *JAMA Network Open*, **4**, e214708 (2021).
2. Y. Xi, and P. Xu, *Translational oncology*, **14**, 101174 (2021).
3. T. P. Brown, and V. Ganapathy, *Pharmacology & therapeutics*, **206**, 107451 (2020).
4. V. Infantino, A. Santarsiero, P. Convertini et al., *International journal of molecular sciences*, **22**, 5703 (2021).
5. A. E. Kabakov, and A. O. Yakimova, *Cancers*, **13**, 1102 (2021).
6. A. Klemba, L. Bodnar, H. Was et al., *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 9492 (2020).
7. A. Emami Nejad, S. Najafgholian, A. Rostami et al., *Cancer Cell International*, **21**, 1 (2021).
8. E. Dratkiewicz, A. Simiczyjew, J. Mazurkiewicz et al., *Cells*, **10**, 862 (2021).
9. X. Sun, X. Lv, Y. Yan et al., *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **130**, 110623 (2020).
10. Y. Xiao, and D. Yu, *Pharmacology & Therapeutics*, **221**, 107753 (2021).
11. N. M. Anderson, and M. C. Simon, *Current Biology*, **30**, R921 (2020).
12. L. Bejarano, M. J. Jordão, and J. A. Joyce, *Cancer Discovery*, **11**, 933 (2021).
13. H. Sadeghi Rad, J. Monkman, M. E. Warkiani et al., *Medicinal Research Reviews*, **41**, 1474 (2021).
14. S. Tan, D. Li, and X. Zhu, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **124**, 109821 (2020).
15. J. D. Martin, H. Cabral, T. Stylianopoulos, and R. K. Jain, *Nature Reviews Clinical oncology*, **17**, 251 (2020).
16. Y. Wang, M. Wang, H. X. Wu, and R. H. Xu, *Cancer Communications*, **41**, 803 (2021).
17. S. Peng, F. Xiao, M. Chen, and H. Gao, *Advanced Science*, **9**, 2103836 (2022).
18. Y. R. Murciano-Goroff, A. B. Warner, and J. D. Wolchok, *Cell research*, **30**, 507 (2020).
19. R. Shi, Y. Q. Tang, and H. Miao, *MedComm*, **1**, 47 (2020).
20. B. Wang, Q. Zhao, Y. Zhang et al., *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **40**, 1 (2021).
21. L. Wan, C. Neumann, and P. LeDuc, *Lab on a Chip*, **20**, 873 (2020).
22. H.-F. Wang, Y. Liu, T. Wang et al., *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **6**, 5040 (2020).
23. X. Cui, C. Ma, V. Vasudevaraja et al., *Elife*, **9**, e52253 (2020).
24. S. H. Lee, R. Bajracharya, J. Y. Min et al., *Pharmaceutics*, **12**, 68 (2020).
25. L. C. Nelemans, and L. Gurevich, *Materials*, **13**, 366 (2020).
26. T. Azimi, M. Loizidou, and M. V. Dwek, *Scientific reports*, **10**, 12020 (2020).
27. T. Collins, E. Pyne, M. Christensen et al., *Biomechanics*, **15** (2021).
28. S. J. Han, S. Kwon, and K. S. Kim, *Cancer Cell International*, **21**, 1 (2021).
29. K.-H. Lee, and T.-H. Kim, *Biosensors*, **11**, 445 (2021).
30. B. Kundu, D. Caballero, C. M. Abreu et al., *Microfluidics and Biosensors in Cancer Research: Applications in Cancer Modeling and Theranostics*, Berlin:Springer, 115 (2022).
31. X. Cai, R. G. Briggs, H. B. Homburg et al., *Biomedical Microdevices*, **22**, 1 (2020).
32. Y. Li, H. Fan, J. Ding et al., *Frontiers in Genetics*, **13**, 969723 (2022).
33. Q. Zhang, G. Kuang, L. Wang et al., *Materials Today* (2024).
34. K. Illath, S. Kar, P. Gupta et al., *Biomaterials*, **280**, 121247 (2022).
35. M. Souri, M. Soltani, F. M. Kashkooli, and M. K. Shahvandi, *Journal of Controlled Release*, **341**, 227 (2022).
36. J. Hu, X. Yuan, F. Wang et al., *Chinese Chemical Letters*, **32**, 1341 (2021).
37. H. S. Abyaneh, M. Regenold, T. D. McKee et al., *Theranostics*, **10**, 1960 (2020).
38. M. J. Mitchell, M. M. Billingsley, R. M. Haley et al., *Nature Reviews Drug Discovery*, **20**, 101 (2021).

作者簡介

江銘仁先生現為國立清華大學生醫工程與環境科學系博士候選人。

Min-Ren Chiang is currently a Ph.D. candidate in the Department of Biomedical Engineering and Environmental Sciences at National Tsinghua University.

邱凱雯小姐現為國立清華大學生醫工程與環境科學系博士班學生。

Hoi Wen Iao is currently a Ph.D. student in the Department of Biomedical Engineering and Environmental Sciences at National Tsinghua University.

胡尚秀先生為國立交通大學材料科學與工程學系博士，現為國立清華大學生醫工程與環境科學系教授。

Shang-Hsiu Hu received his Ph.D. in Materials Science and Engineering from National Yang Ming Chiao Tung University. He is currently a Professor in the Department of Biomedical Engineering and Environmental Sciences at National Tsinghua University.

癌症晶片用於新藥開發與用藥指引之潛力

Exploring the Potential of Cancer Chips in Novel Drug Development and Clinical Drug Guidance

林巧旻、黃振煌

Chiao-Min Lin, Jen-Huang Huang

癌症研究與治療之所以困難是因為腫瘤本身的微環境其複雜性極高，從早期藥物開發到後期臨床用藥選擇都面臨種種挑戰。這歸咎於現有的體外或動物模型難以準確並再現這種複雜情境，而癌症晶片的出現為解決這一困境帶來了希望。近期隨著晶片製造的技術突破，這項技術逐漸成熟，並能夠更好地模擬腫瘤微環境。本文介紹癌症晶片的發展，以及本團隊所開發的新技術，期望能在未來提供癌症相關研究和治療藥物開發新的選項。

The complexity of cancer research and treatment is rooted in the intricate microenvironment of tumors. Challenges emerge at each phase, ranging from the initial stages of drug development to the process of selecting drugs for clinical application. This limitation arises from the challenges faced by existing in vitro or animal models in accurately reproducing this complex scenario. The development of cancer chips offers promise in addressing this challenge. Recent advancements in chip manufacturing have led to the maturation of technology that more accurately mimics the tumor microenvironment. This article presents the evolution of cancer chips and our team's novel technology, with the objective of providing innovative pathways for cancer research and the advancement of therapeutic drugs in the future.

一、前言

1. 癌症藥物開發的痛點

癌症藥物開發是一個漫長且昂貴的過程。平均而言，發展一種新藥並且推向市場需要 10 到 15 年的時間，成本在 10 億至 200 億美元之間。然而，在這個過程中，候選藥物經過嚴格的體外篩選進入臨床試驗後，大約有 80% 的藥物在試驗期間失敗，因為其有效性與體外結果的預期不符 (圖 1)。此外，在臨床治療案例中，常常出現患者對治療的反應不佳和不良的預後情況。這是由於患者之間的異質性，無法使用通用的治療指引來解決，並且沒有有效的方法來預測治療結果⁽¹⁾。

在生物醫學領域中，忠實地再現體內微環境對於精確的藥物篩選至關重要。在癌症研究領域，廣泛採用的二維 (2D) 細胞培養系統作為體外模型來進行初步的藥物有效性測試，但其未能再現人體內複雜的腫瘤生理，無法預測藥物的實際療效，潛在導致超過 80% 的潛在癌症藥物在臨床試驗的第二和第三期失敗。這凸顯了對能夠實現精確的臨床前藥物篩選的體外模型的需求。另一方面，體內模型也就是動物模型目前仍是作為臨床前驗證的黃金標準，但其具有高成本、低通量、操作複雜以及道德倫理等問題，近來，科學家嘗試找到減量動物實驗的方法，而更貼近真實體內微環境的體外模型就是其一解方。

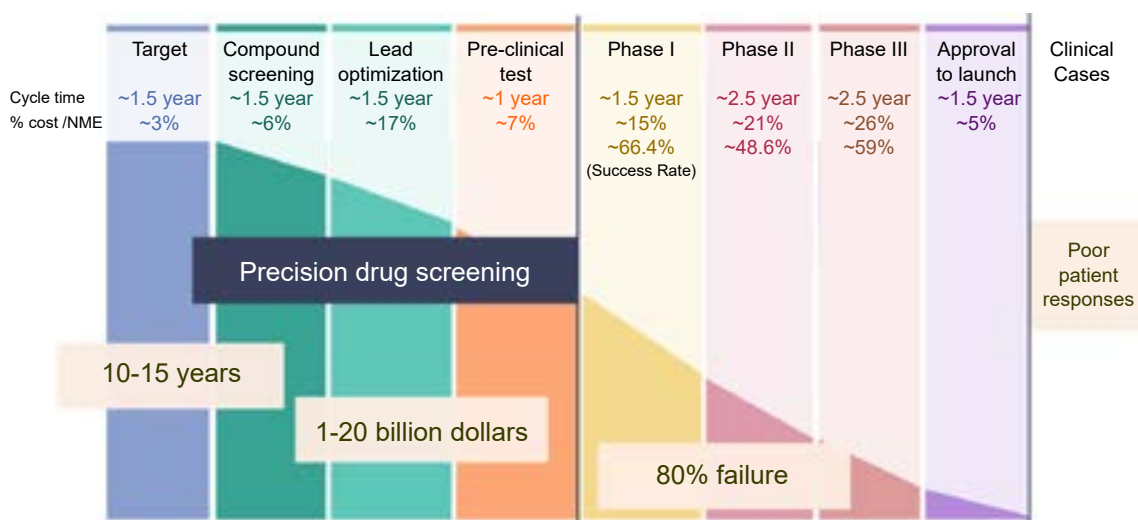


圖 1. 藥物發展的過程。

2. 腫瘤微環境

腫瘤微環境是一個由基質細胞和細胞外基質主要組成的複雜且動態演化的環境。腫瘤微環境內的動態相互作用刺激著癌細胞的異質性和發展，最終導致癌細胞對藥物的抵抗、癌症進展和轉移。在腫瘤發展過程中，由於某些區域血管形成異常和血液供應有限，癌細胞和基質細胞通常會經歷營養和氧氣匱乏。腫瘤細胞的快速代謝導致腫瘤內廢物的積累，使腫瘤的 pH 值降低。因此，在腫瘤內，細胞在飢餓、缺氧和酸性等惡劣條件下表現出不同的特徵，促進了癌症的進展。這些特徵包括改變基因表達、逃避免疫系統、增強自噬、抑制細胞凋亡、促進上皮-間質轉化、增加血管新生和促進遠端轉移。惡劣的腫瘤微環境顯示出對於傳統癌症治療的重大挑戰，並且與較差的預後情況相關。

腫瘤微環境內的細胞異質性在癌症研究中至關重要。該微環境包括各種細胞類型，如免疫細胞、肌肉細胞、血管細胞、脂肪細胞、基質細胞等，每種細胞具有不同的功能和相互作用 (圖 2)。免疫細胞如細胞毒性 T 細胞和自然殺手細胞致力於摧毀癌細胞，但它們的功能在免疫抑制的腫瘤微環境中可能受到壓制。了解腫瘤與免疫細胞之間的動態相互作用對於有效利用免疫治療至關重要，包括癌症疫苗、基於細胞的治療和免疫檢查點抑制劑等。肌肉細胞和基質細胞提供結構支持，但也可能參與癌症的生長和擴散。血管細胞促進血管新生，為腫瘤提供營養，但也可能成為癌細胞的通道。此外，脂肪細胞和基質細胞釋放生長因子和細胞因子，推動癌症的進展。細胞相互作用的多樣性影響腫瘤的生長、轉移和治療反應。因此，了解細胞異質性如何影響癌症研究和治療至關重要⁽²⁾。

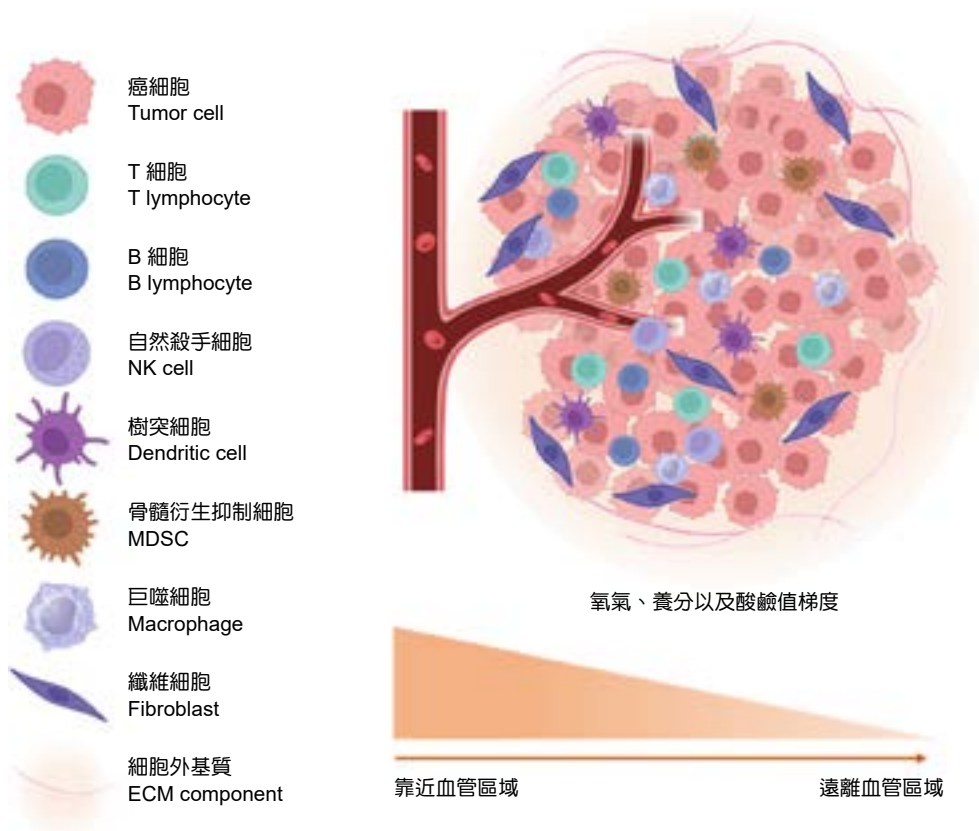


圖 2. 複雜且多樣的腫瘤微環境。

考慮到上述的腫瘤微環境特徵，雖然三維細胞培養系統的出現部分解決了二維培養的局限性。然而，傳統的三維培養仍然無法複製組織級別的複雜性，例如：血液流動、組織之間的動態流體流動、以及各種細胞類型之間的細胞間相互作用或由環境引起的區域特定的反應。因此，建立一個更準確和實用的體外模型就有其必要性。癌症晶片技術的開發有效地彌合了二維培養和動物模型留下的差距。相較於傳統的三維培養，此技術能通過利用微流體技術來傳遞信號和物質，並有效模擬體內的組織壓力，以便提供更高的藥物篩選精確度。

二、癌症晶片建立之考量因素

癌症晶片系統為一種微型細胞培養裝置，在體外模擬腫瘤組織的結構和生理特徵。這些晶片可用於模擬癌症從早期到晚期病變的進展，包括腫瘤的生長、擴張和血管生成，以及上皮間質轉化、腫瘤細胞的侵襲和轉移。

癌症晶片的製造在基礎上與器官晶片類似，需要考慮許多因素 (圖 3)⁽³⁾。首先，設計和製造晶片結構時，材料的選擇至關重要，以滿足晶片的應用需求。例如：聚二甲基矽氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 是一種常用的彈性材料，具有優異的光學透明性和生物相容性，因此適合用於製造微流體裝置。加工技術上，微影術技術是製造晶片結構的常見方法，通過使用光罩和光刻技術來定義晶片的結構，包括微通道和微結構。一項癌症轉移晶片的研究，便使用軟光刻技術加工 PDMS 材料，建立了一個串聯多個器官的轉移模型⁽⁴⁾。此外，微機電系統技術也可以應用在晶片的製造過程中，利用微加工技術在微米尺度上製造結構和設備，例如微流道和微幫浦等。

然而腫瘤和正常器官不同，癌症晶片具有獨特的設計來貼合多樣的腫瘤生態。由於癌症是高度異質性的疾病，相對於一般器官晶片，創造出具有良好空間分辨率的複雜結構，以還原腫瘤異質微環境是至關重要的。近年來，許多研究應用逐層列印的生物列印技術建造癌症晶片，該技術可以將各種生物材料以及不同細胞類型同時列印至生物相容之基底結構上，以利科學家研究觀察在不同空間及環境下的腫瘤樣態、疾病進展以及治療策略。另外，由於癌細胞具有遷徙至其他器官的特質，許多癌症轉移模型會在系統中加入屏障結構，或是多層水膠，來還原癌細胞侵襲至不同環境的情境。在 2016 年的一項研究中，使用了 3D 列印技術將不同種類細胞和生物材料成功定位在所需位置，無需二次細胞接種過程即可一步製造生物晶片⁽⁵⁾。

整合微流體系統也是建立癌症晶片的重要步驟。在這個步驟中，需要設計適合腫瘤組織的微流體通道結構，以模擬腫瘤微環境中的流體動力學。通過調整通道的幾何形狀、大小以及應用外部壓力或流速，可以實現對流體流動的精確控制，從而更好地模擬真實的生物環境。實體腫瘤和一般器官不同，具有血管結構異常的特性，而腫瘤組織深層無法利用血管進行物質交換之處，則仰賴間質液的流動，用擴散來達到養分及氧氣的遞送，而這樣的特性則使得實體腫瘤中生理梯度的產生。為了模擬這樣的情境，需要特殊的微流道設計，部分研究會使用額外的二氧化碳或是氧氣通道調節含氧梯度，氧氣的濃度則間接導致其他如養分或酸鹼值的梯度，藉此模擬真實腫瘤狀況^(6,7)。

癌症晶片系統與器官晶片系統另一個不同之處在於通過在組織中使用癌症衍生細胞和相關的基質來替代健康細胞和組織。即使是同一種癌種，選擇適當的癌細胞是個重要的課題，需考量要模擬疾病的哪種階段或過程，例如：在轉移模型中可依需求選擇高侵襲性的細胞或是有冬眠特質的癌細胞，來分別進行癌細胞侵襲以及復發的研究。需注意腫瘤中並不只有癌細胞，包括其他基質細胞如纖維細胞、表皮細胞以及免疫細胞等，在當中加入一種以上的細胞可幫助模擬癌症異質性。另外，癌症晶片可接軌動物以及臨床研究，利用動物或是病患來源的組織，可進行額外的處理或是擴增，再放入晶片進行培養。此應用可幫助動物減量，或是臨床端更快的取得相關數據。

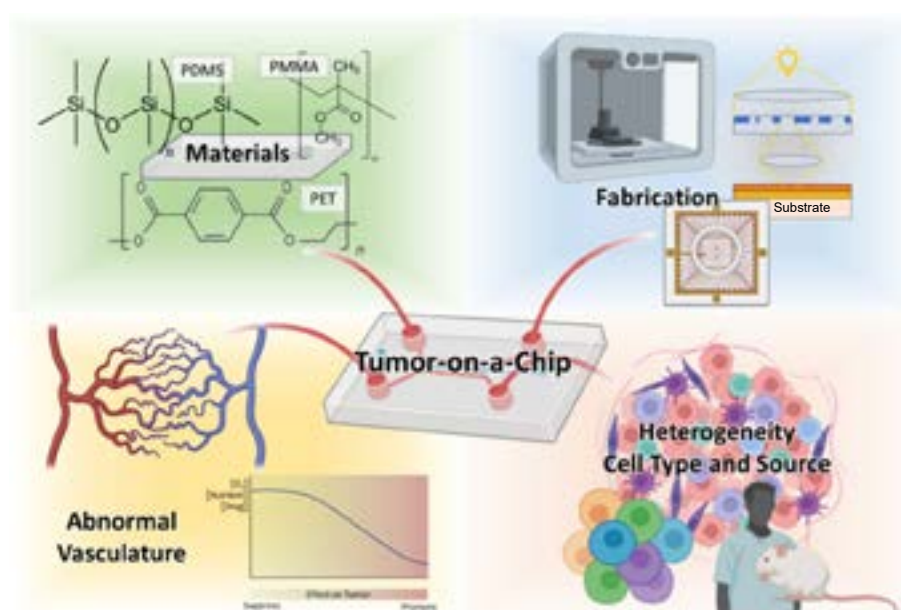


圖 3. 癌症晶片建立之關鍵考量。

三、現有癌症晶片的特點

腫瘤晶片通過整合三維組織培養系統和微流體學，可以忠實地複製腫瘤微環境。它們已被應用於各種癌症類型的晶片開發，包括肺癌、結腸直腸癌、腦癌、肝癌等。除了癌種的不同，研究者會針對特定機制以及癌症特性設計專門的癌症晶片來了解特定問題並找到解方。

1. 腫瘤細胞以及基質細胞的相互作用

微流體模型通常使用細胞外基質成分和水凝膠來再現三維腫瘤微環境。這些基質支持基質細胞的生長，實現多種細胞類型的共培養。在一項仿生腫瘤微環境模型研究中，通過模擬腫瘤、基質細胞和內皮細胞之間的複雜相互作用，重建了腫瘤微環境的關鍵組成部分。該模型利用微流體平台，成功測試了細胞外基質和基質對腫瘤細胞生理學和血管生成的影響。研究還重建了腫瘤微環境中血管生成和淋巴管生成的同時發生，以及腫瘤細胞之間的相互作用。研究結果顯示，在共培養狀態下，成纖維細胞誘導了不同類型的癌細胞顯著的形態變化，表現出增殖作用。此外，血管生成的仿生模型顯示，不同類型的癌細胞與成纖維細胞的共培養對血管生成表現出不同的影響。具體來說，一些條件下癌細胞與成纖維細胞的共培養增加了血管生成的發芽長度，由於成纖維細胞的存在，在 48 小時內癌細胞形態發生變化。細胞相互作用調節了與血管生成相關的因子分泌，在與成纖維細胞的共培養中才會誘導血管生成。這突顯了腫瘤微環境成分之間的相互作用在疾病進展中的重要性⁽⁸⁾。

2. 腫瘤異質性

腫瘤細胞由具有不同表型、細胞密度或位於腫瘤內不同空間位置的各種細胞群組成，造成了高度異質性，使疾病難以預測及監控，在癌症治療中仍然是一個重大障礙，而腫瘤晶片是觀察細胞異質性的高效工具。在一項最近的研究中，成功在一個 3D 列印的乳腺癌腫瘤微環境晶片進行定位和排列的精確控制，且該晶片中共培養了兩種細胞類型。這種方法可用於模擬腫瘤異質性，提供了研究腫瘤微環境時空解析度的機會。

這項技術的關鍵在於製備生物墨水對細胞活力和生物列印適性的評估。初步研究中，研究人員製備了含有不同比例海藻酸鹽和明膠的水凝膠，並使用具有不同直徑的噴嘴進行生物列印。他們發現使用較大直徑的噴嘴有利於細胞活力，而較小直徑的噴嘴提供了更高的分辨率。通過混合不同細胞型態的生物墨水，他們成功地製造了具有不同細胞分佈的生物列印結構。生物列印後的細胞活力得到了證實，並且觀察到細胞在 3D 矩陣中的均勻分佈。

此外，研究人員還通過微流體裝置動態生成化學梯度，模擬了腫瘤組織中的化學環境，並觀察到細胞對化學引誘劑的遷移行為。他們使用表皮生長因子 (epidermal growth factor, EGF) 作為化學引誘劑，並通過共軛焦顯微成像技術觀察了細胞在 3D 生物列印結構中的遷移情況。結果顯示，具有不同比例的癌細胞和非癌細胞的共培養物對 EGF 的反應不同，這提供了一種模擬腫瘤微環境中細胞行為的有效方法。

通過建立共培養模型，可以更好地了解不同細胞類型之間的相互作用對癌症轉移的影響。藉助於微流體裝置可以模擬腫瘤微環境中的異質性，並觀察癌細胞的遷移行為⁽⁹⁾。

3. 環境梯度

環境梯度是腫瘤微環境中的關鍵因素，對腫瘤內異質性起著重要作用。先前的研究表

明，癌症晶片可以在晶片上產生各種環境因子的梯度。Ando 等人⁽⁶⁾ 使用擴散障壁模擬腫瘤中的氧氣梯度。該裝置包括一個帶有中心柱以及上蓋的結構，並使用聚碳酸酯作為材料，以建立氧氣屏障。通過 COMSOL Multiphysics[®] 成功地模擬了裝置中氧氣的空間和時間分佈。結果顯示，裝置內部的氧氣含量在前 10 分鐘內迅速下降，30 分鐘後達到穩態。為了實際測量裝置中的氧氣梯度，作者將氧氣感測螢光標記物嵌入微型裝置中。通過對二氧化矽微粒進行螢光標記，能夠觀察到裝置中氧氣的分佈情況。結果顯示裝置中心的氧氣含量較低。此外，將氧氣感測器的螢光訊號進行了定量分析，並與 COMSOL 模擬結果進行了比較，發現兩者之間具有良好的匹配性。

進一步的實驗顯示，裝置中的細胞對缺氧環境做出了反應。通過免疫螢光分析，觀察到了缺氧標記物的上調，並且發現 Glut-1 基因在裝置中明顯上調。另外，對不同氧氣濃度下細胞的基因表現進行分析，發現在缺氧區域中，細胞增殖下調，而與細胞凋亡、糖酵解和遷移／轉移相關的基因表現上調。最後，作者對裝置中的細胞進行了藥物治療實驗，結果顯示，在缺氧狀態下，細胞對 TPZ 藥物 (一種針對缺氧區域下細胞作用的藥物) 的反應更為顯著，而在其他條件下則沒有明顯差異。這些研究結果顯示，這種新型的微型裝置可以模擬出腫瘤中的缺氧環境，並且可以用於研究細胞在不同氧氣條件下的行為和藥物反應⁽⁶⁾。

4. 環境梯度對免疫反應的影響

免疫浸潤在實體腫瘤治療中起著關鍵作用。腫瘤利用多種機制。在實體腫瘤中，惡劣的微環境可能會抑制免疫細胞功能並誘導耗竭，包括營養耗盡、酸性 pH 和廢物累積等因素。Ayuso 等人⁽⁷⁾ 在腫瘤晶片上建立養分、pH 值和壞死梯度，以評估 NK 細胞的細胞毒性和消耗。該模型中，乳癌細胞帶有或不帶有 NK 細胞嵌入了中央微室，並且通過膠原水凝膠產生內腔，模擬了營養物質的不對稱分佈。

研究發現，不同區域的細胞活力呈現不同情況，其中近端區域的腫瘤細胞活力高，而遠端區域的腫瘤細胞活力則較低。NK-92 細胞的存在導致近端區域腫瘤細胞活力下降，並且沒有觀察到 MCF7 細胞簇。進一步的分析顯示，NK-92 細胞在微裝置中表現出活力，但其細胞毒性能力下降。這種 NK 細胞的耗竭伴隨著多種基因表達的變化，包括與免疫招募和免疫抑制相關的基因的上調。與近端區域相比，遠端區域的 NK 細胞具有不同的基因表達譜，表明微裝置中的不同區域對細胞表現產生不同的影響。

此研究結果突顯了實體腫瘤微環境對免疫反應的影響。晶片上的腫瘤平台顯示出更嚴重的免疫耗竭，並且觀察到耗竭標記物的上調，這在傳統的孔板實驗中未曾觀察到。此外，研究還評估了從抑制環境中移除的疲憊免疫細胞是否可以恢復其原始表型，結果顯示腫瘤微環境對 NK 細胞的生物學產生了長期影響。這些發現提供了對克服腫瘤微環境對免疫治療的挑戰的深入理解，並強調了發展新的治療策略的重要性⁽⁷⁾。

儘管先前的研究顯示癌症晶片具備模擬腫瘤微環境的能力，但大多數仍然無法完全還原其複雜性。相關之技術與再現之腫瘤微環境列於表 1。目前，對於區域性藥物反應的實時評估缺乏有效的工具。此外，許多晶片需要複雜的製造工藝，缺乏建立氧氣梯度的簡單方法，並且缺乏清晰的可視化技術，以快速評估藥物的功效。需要進一步研究以推動技術的進步，實現精確的藥物篩選。

表 1. 已發展之癌症晶片技術與其再現之情境。

再現之情境	關鍵技術	結果	文獻
腫瘤和基質細胞之相互作用	將多種癌細胞、纖維以及內皮細胞共培養於含有水膠的不同通道中	癌細胞與纖維細胞的共培養促進血管生成	(8)
腫瘤異質性	利用 3D 列印形成具有空間分辨率的結構，並以微流體創造化學梯度	不同細胞比例共培養對 EGF 反應及遷徙行為不同	(9)
環境梯度	建立擴散屏障導致氧氣梯度生成	缺氧環境中細胞表現出對應的生理以及藥物反應	(6)
環境梯度下的免疫響應	利用水凝膠管道建立養分、pH 值和壞死梯度以評估 NK 細胞狀況	遠端腫瘤環境對 NK 細胞功能造成不可逆影響	(7)

四、新型腫瘤微環境晶片

1. 免疫合併治療的困境

免疫治療合併其他療法已成為提高癌症治療效果的重要策略，包括化學免疫療法和標靶免疫療法的結合。儘管使用單獨治療策略的成功率有限，但合併療法已顯示出改善的結果。美國食品藥物管理局在 2018 年已批准將帕博利珠單抗 (pembrolizumab, PD-1) 與化療合併，作為非小細胞肺癌的一線治療方案。在一項涵蓋 559 名患者的第三期臨床試驗中，接受合併治療 (帕博利珠單抗加卡铂和紫杉醇或白蛋白結合型紫杉醇) 的患者的中位總存活期為 15.9 個月，而單獨接受化療患者的中位總存活期為 11.3 個月。而追究單獨使用免疫檢查點抑制劑 (immune checkpoint inhibitor, ICI) 的響應率低下原因，則需要回過頭探討腫瘤微環境內的各種因素，包括缺氧、營養匱乏和酸度等，這些因子皆可導致免疫抑制。除此之外，腫瘤微環境中的基質細胞，包含功能失調 T 細胞以及纖維細胞增生，對 ICI 的有效性以及免疫細胞浸潤功能都造成了損害。

調節腫瘤微環境內部免疫抑制的合併療法有望優化免疫治療的結果。然而，由於缺乏具有生理代表性的平台，開發和篩選有效的免疫療法組合仍面臨障礙。如前所述，傳統的 2D 細胞培養模型無法準確反映腫瘤微環境中細胞的異質性和多樣性。因此，研究人員將 3D 球體作為藥物篩選的高通量平台，但仍然存在細胞球之間差異性的問題。另一方面，動物模型具有模擬人類複雜性和藥物反應的能力，但可重複性差且耗時。為了克服這些限制，本團隊開發了腫瘤微環境晶片 (tumor-microenvironment-on-chip, TMoC) 平台⁽¹⁰⁾，能夠重建腫瘤微環境的複雜特性，包括氧梯度和細胞異質性，同時具有化合物和細胞動態循環特點 (圖 4)。透過 TMoC，研究人員可以在可控和可重複的環境中評估合併免疫療法的療效，從而增強對腫瘤微環境複雜性中藥物反應的理解。

與傳統的藥物篩選方法相比，TMoC 的分析方式可加快免疫治療藥物篩選的過程。在實驗過程中，將細胞與基質溶液混合，然後植入晶片。隨後，通過連接蠕動幫浦，引入藥物模擬體內腫瘤治療。TMoC 腫瘤的建立在一小時內完成 (不含腫瘤解離時間)。藥物處理後，可以通過顯微鏡觀察或組織提取進行後續分析。總的來說，評估目標藥物的抗癌作用僅需要不到 36 小時，大大降低藥物篩選的時間。

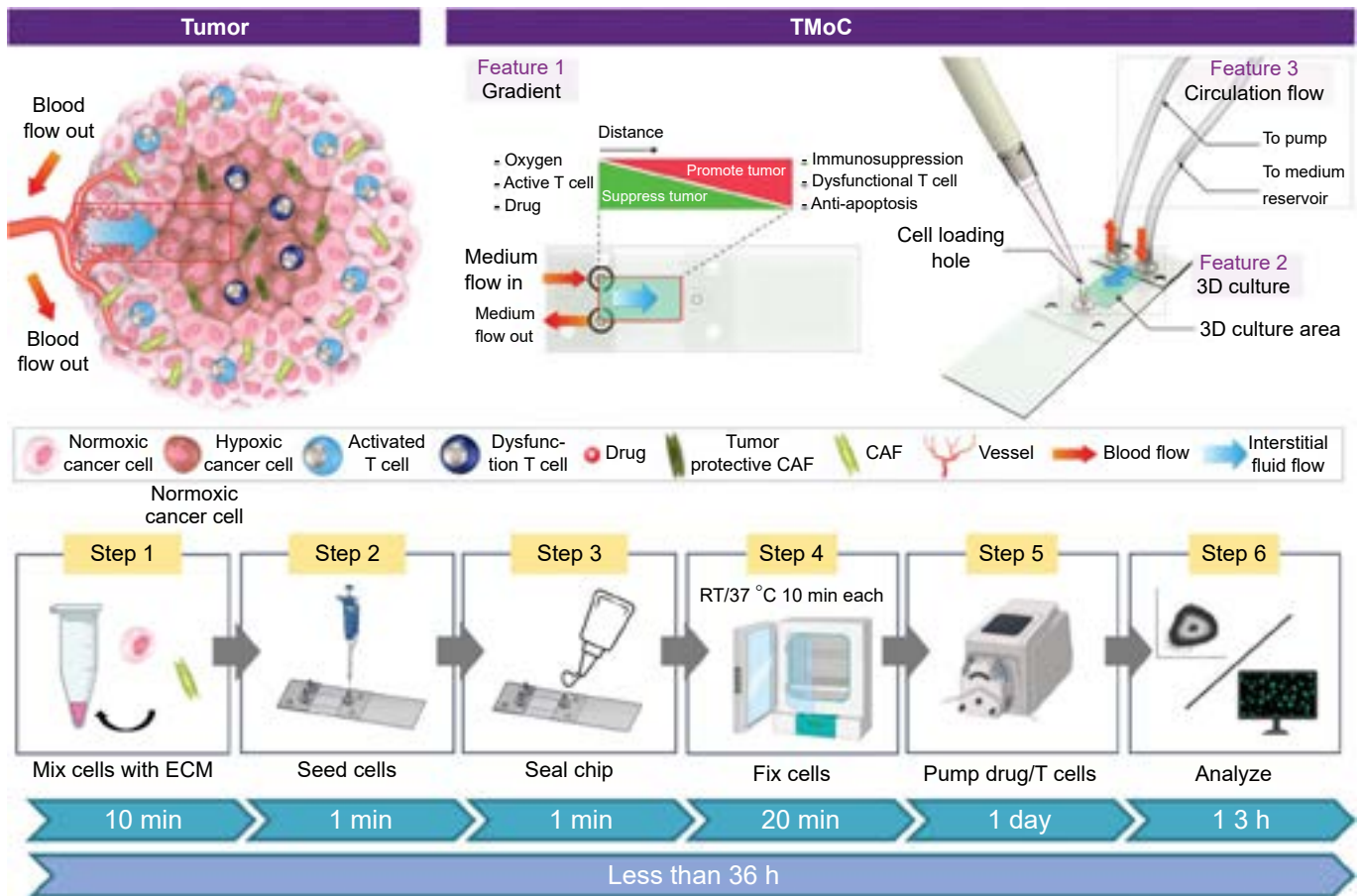


圖 4. TMOc 技術概要與操作步驟⁽¹⁰⁾。

2. TMOc 中腫瘤微環境的建立

TMOc 中的腫瘤微環境建立主要是將癌細胞、成纖維細胞或腫瘤解離細胞的混合物與基質成分 (膠原蛋白或 Matrigel) 結合，並通過細胞注入孔注射到晶片的 3D 培養區域。接著，細胞注入孔被密封且僅單邊微流道輸送機制，加上細長的培養區域設計，便可以在整個培養區域中產生營養物質、氧氣和其他生理因子的精確梯度，以達成分子梯度和缺氧誘導的腫瘤異質性 (圖 5(a))。在 3D 密閉空間內培養的植入細胞可以類比成腫瘤切片，這適用於進一步的分析，無需等待腫瘤在體外增殖。此外，晶片內的細胞能夠持續獲得新鮮培養基的供應，從而保持它們的活性。

為了探討培養面積縱橫比對培養中氧氣梯度的影響，本團隊將小鼠三陰性乳癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 細胞和成纖維細胞培養在基質中。通過分析晶片的不同區域，團隊發現 1 : 2 (長 × 寬 : 10 × 20 mm) 是缺氧誘導因子 HIF-1 α 信號在常氧以及缺氧區間差異最大化的選擇 (圖 5(b))。使用缺氧探針螢光染色結果確認了晶片中的氧氣梯度存在，並在離循環系統較遠的地方觀察到更強的缺氧信號 (圖 5(c)、5(d))。RNA 測序顯示，與常氧區相比，缺氧區的癌細胞表現出增強的 HIF-1 誘導的信號傳導和糖酵解特徵，而 DNA 複製和細胞週期過程受到抑制 (圖 5(e))。我們同時也觀察到腫瘤異質性在晶片上被複製 (圖 5(f))。在透過免疫治療藥物 (圖 5(g)) 以及免疫合併治療後的腫瘤基因表現 (圖 5(h)-5(k))，得知這些發現提供了 TMOc 系統能夠產生缺氧以及生理梯度極其有利的證據。

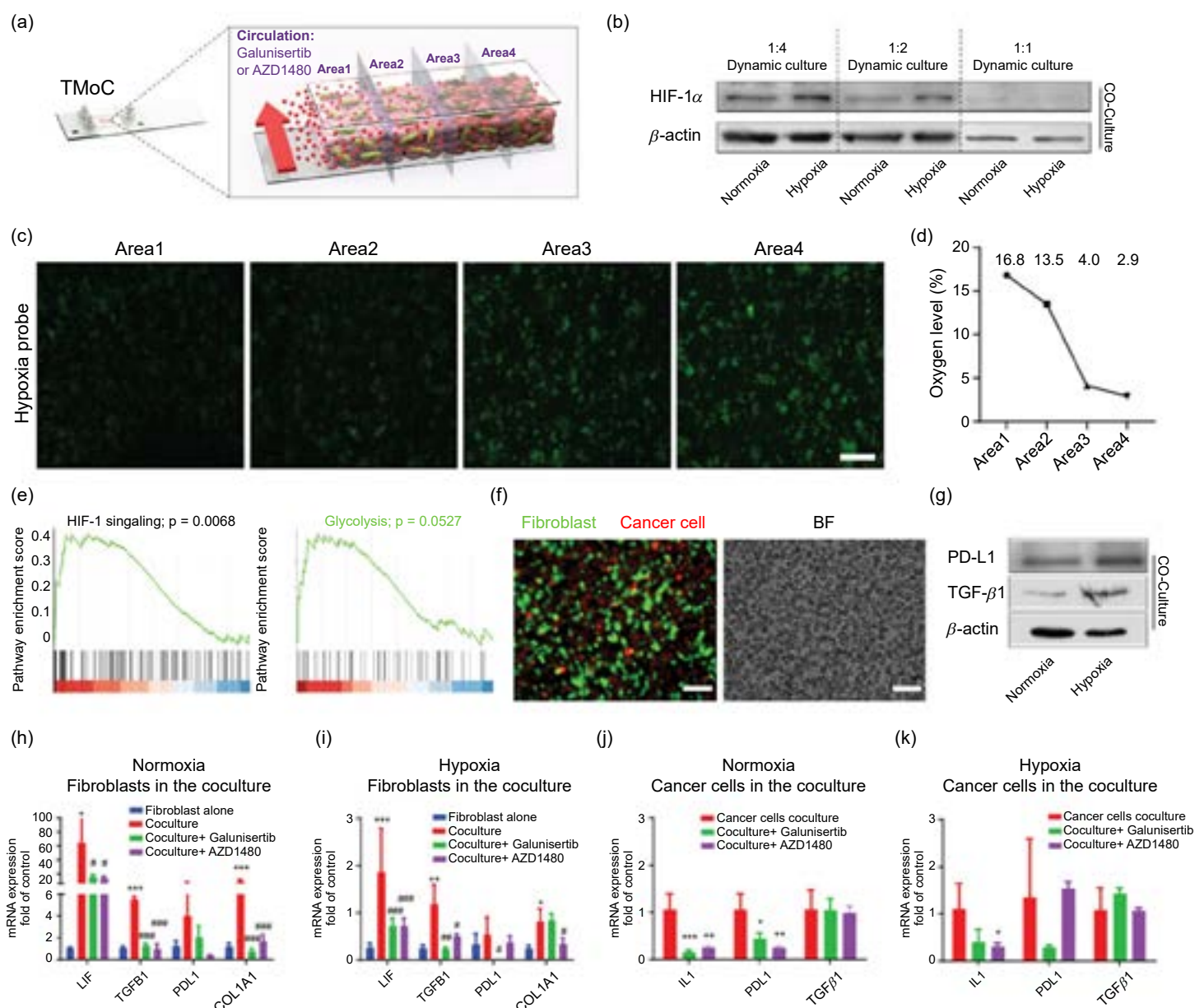


圖 5. TMoC 透過環境梯度的建立模擬腫瘤微環境⁽¹⁰⁾。

3. TMoC 作為化學免疫治療用藥指引

儘管存在通用的臨床用藥指引，但實際上評估化學免疫治療於 TNBC 的臨床療效存在著困難點。由於該癌種異質性高，且不存在賀爾蒙陽性作為靶位治療，找到符合所有情境的用藥十分艱難，因此 TMoC 作為個人化藥物篩選的平台是有潛力的。我們透過 TNBC 小鼠來源的腫瘤組織來類比藥物反應。這個過程包括解離腫瘤組織，解離成單細胞，並選擇性地使用 Annexin V 磁珠標記去除凋亡細胞。然後，研究團隊將這些細胞移植到 TMoC 平台上。在培養 24 小時後，使用螢光顯微鏡捕捉細胞凋亡信號 Caspase 3/7，並分析了從循環系統附近的近端區域（區域 1）到遠端區域（區域 8）。接著對這些區域的凋亡信號強度進行了量化分析，以建立藥物指引。凋亡強度較高的藥物被認為具有更好的療效，而凋亡強度較低的藥物則不太適合臨床使用。

在化療篩選中，我們評估了一組五種藥物：順鉑 (cisplatin)、紫杉醇 (paclitaxel)、好復注射液 (5-Fluorouracil)、甲氨蝶呤 (methotrexate) 和溫諾平 (vinorelbine) 的療效 (圖 6)。與對照組相比，結果顯示所有藥物都引起了更強的細胞凋亡信號。根據 TMoC 提供的用藥指引，紫杉醇為最有效的藥物，而順鉑則是最不推薦的。接著我們繼續進行化學免疫治療篩選。根據 TMoC 的用藥指引，順鉑與抗 PD-1 抗體合併使用有最佳療效，而溫諾平與抗 PD-1 的組合則療效最差。

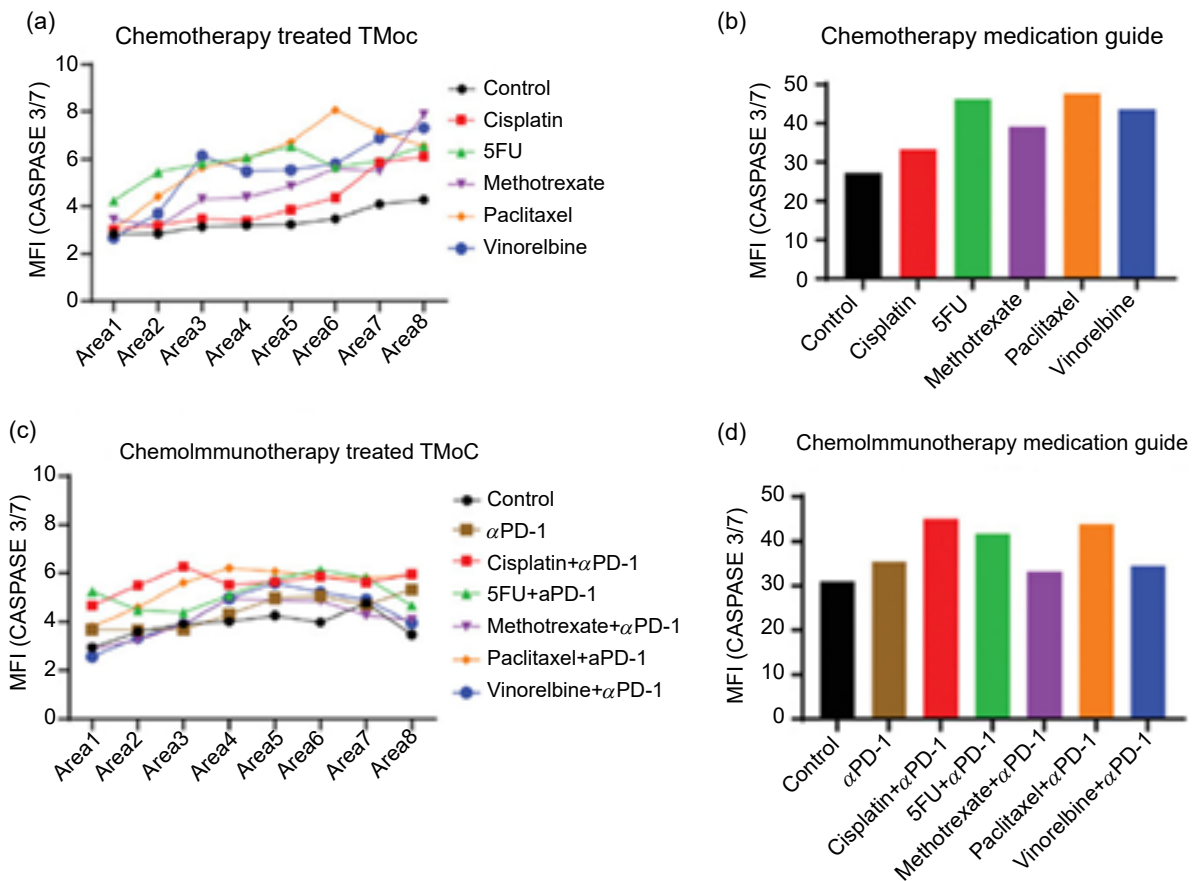


圖 6. 使用 TMoC 進行的藥物療效篩選。(a)、(b) 化療用藥指引，(c)、(d) 化學免疫治療用藥指引⁽¹⁰⁾。

為了驗證這些用藥指引的準確性，我們使用臨床文獻中報告的最大血清劑量，對小鼠 TNBC 模型進行了靜脈注射 (化療藥物) 以及腹腔注射 (抗 PD-1 抗體)，並將治療持續時間和濃度與 TMoC 循環系統中的相應參數相匹配，以類比臨床環境 (圖 7)。腫瘤大小分析結果顯示，在單一化療組別中，紫杉醇治療組腫瘤大小相較對照組減少了 28%，而順鉑只減少了 3%。在化學免疫治療組別中，順鉑聯合抗 PD-1 抗體組的腫瘤相較對照組減少了 52%，而溫諾平合併抗 PD-1 抗體組減少了 36%，和對照組相比皆存在顯著差異。以上發現也都得到了腫瘤切片分析的進一步證實。

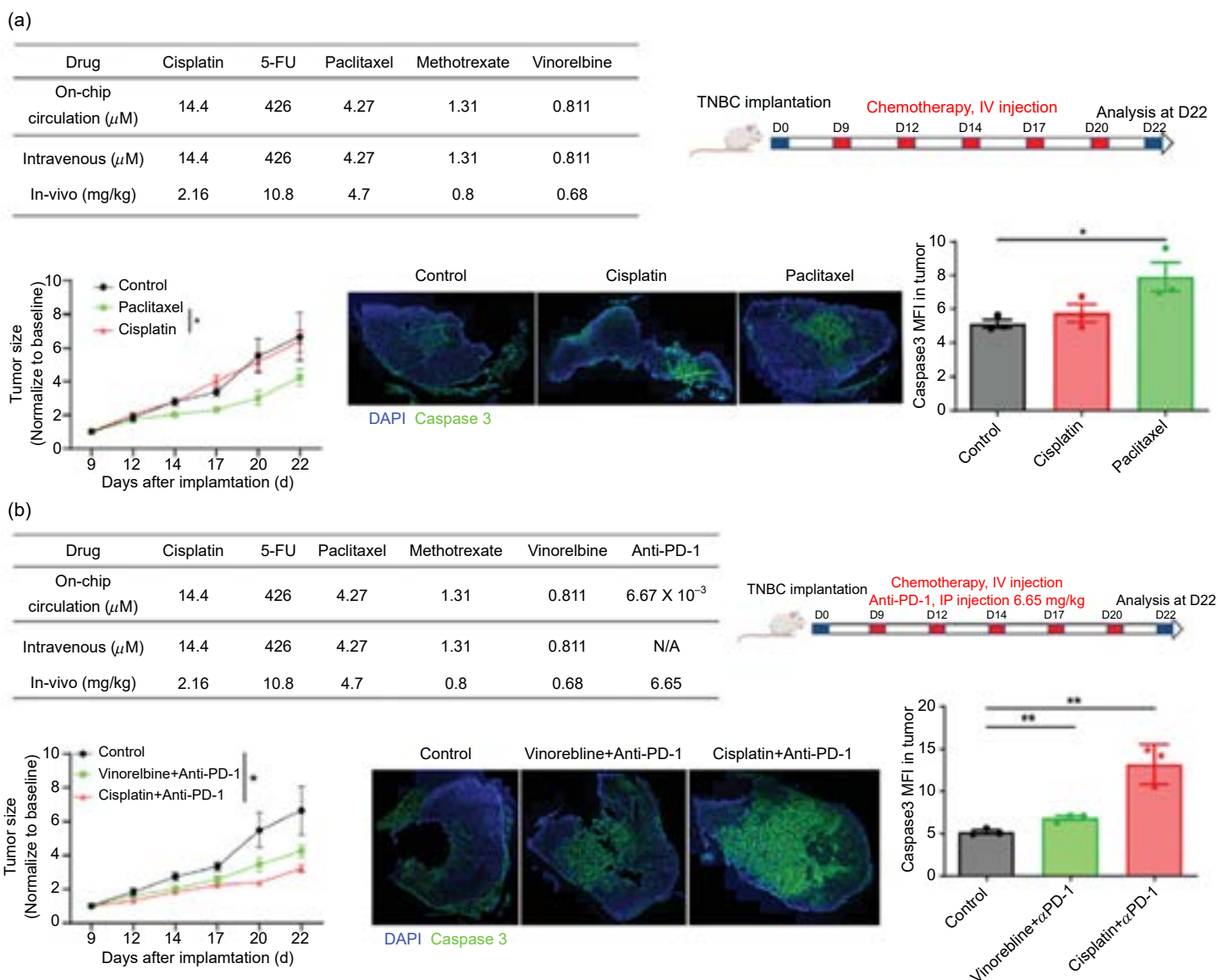


圖 7. 利用動物實驗驗證 TMoC 藥物指引的準確性。(a) 化學治療，(b) 化學免疫治療⁽¹⁰⁾。

最後，為了評估藥物組合在更類似於體內條件的環境中的反應，我們使用小鼠肉瘤細胞分泌的可溶性基底膜基質 (Matrigel[®], Corning Life Sciences, USA) 代替小鼠來源膠原蛋白，並將此改變延用至往後的實驗中。我們研究了在 TMoC 的不同時間點施用免疫原性細胞死亡誘導劑以及抗 PD-1 抗體的有效性。TMoC 不僅能評估長期的反應，而且還顯示了其應用於多樣給藥策略的能力，這是對於實際臨床應用十分關鍵。整體來說，這些結果確認了 TMoC 作為用藥指引的精準度。

五、結語

在癌症研究領域，癌症晶片作為一種全新概念的體外模型，彌合了傳統二維和三維培養系統，以及動物模型之間的差距，提供了更精確的藥物測試以及疾病模擬。考慮到腫瘤微環境的複雜性和細胞異質性對癌症研究和治療的影響，癌症晶片近來已發展需多可模擬生理情

況的技術，包括血液流動、組織間的相互作用以及由環境因素引起的反應。本研究團隊所開發的 TMoC 平台，其獨特之處在於能重建腫瘤組織中的複雜特性，包括氧氣梯度、細胞異質性以及化合物和細胞的動態循環。透過 TMoC，研究人員可在可控的環境中快速地評估藥物的抗癌作用，並提供個人化的用藥指引，使得臨床治療更加精準和有效，也為未來癌症治療策略的優化提供了重要參考。

參考文獻

1. D. Sun *et al.* *Acta Pharmaceutica Sinica B* **12**, 3049 (2022).
2. R. Baghban *et al.* *Cell Communication and Signaling* **18**, 1 (2020).
3. X. Liu *et al.* *Microsystems & Nanoengineering* **7**, 50 (2021).
4. A. Skardal *et al.* *Biotechnology and bioengineering* **113**, 2020 (2016).
5. H. Lee *et al.* *Lab on a Chip* **16**, 2618 (2016).
6. Y. Ando *et al.* *Scientific Reports* **7**, 15233 (2017).
7. J. M. Ayuso *et al.* *Science Advances* **7**, eabc2331 (2021).
8. M. Chung *et al.* *Advanced healthcare materials* **6**, 1700196 (2017).
9. N. Moghimi *et al.* *Scientific Reports* **13**, 13648 (2023).
10. H. Y. Mu *et al.* *Advanced Healthcare Materials* **13**, 2302268 (2024).

作者簡介

林巧旻女士為國立清華大學生醫工程與環境科學系學士，現為國立清華大學化學工程研究所碩士生。

Chiao-Min Lin received her B.S. in the Department of Biomedical Engineering and Environmental Sciences at National Tsing Hua University. She is currently a M.S. student in the Department of Chemical Engineering at National Tsing Hua University.

黃振煌先生為美國德州農工化學工程博士，現為國立清華大學化學工程學系副教授。

Jen-Huang Huang received his Ph.D. in Chemical Engineering from Texas A&M University, USA. He is currently an Associate Professor in the Department of Chemical Engineering at National Tsing Hua University.

腫瘤血管新生測試之三維細胞球 共培養微流體晶片技術

A Microfluidic 3D Cell Spheroid Co-culture Technique for Tumor Angiogenesis Testing

羅明心、謝菲尼、許佳賢

Didem Rodoplu Solovchuk, Jefunnie Sierra Matahum, Chia-Hsien Hsu

體外模擬腫瘤血管新生模型可以用來研究腫瘤血管新生機制與進行抗腫瘤血管新生藥物測試。利用類胚狀體 (embryoid bodies, EBs) 和腫瘤細胞球 (tumor spheroids, TSs) 的共培養可以在體外模擬腫瘤血管生成。在這裡我們介紹一種基於微流體懸吊滴技術的三維細胞球體共培養裝置 (microfluidic hanging drop-based spheroid co-culture device, μ -CCD)，可以透過簡單的手動操作程序和設定來產生和共培養類胚狀體和腫瘤細胞球。這項技術可以在一個微流體晶片上相鄰的八對懸吊液滴內形式生成大小均勻的類胚狀體和腫瘤細胞球，然後再透過合併液滴來配對培養類胚狀體和腫瘤細胞球使得球體以研究腫瘤誘導血管生成萌芽。我們透過最佳化裝置的物理參數讓懸吊液滴可保持長達十天的穩定性。我們利用小鼠 ES-D3 胚胎幹細胞株、MDA-MB-231 和 MCF-7 乳癌細胞株來生成類胚狀體、侵入性腫瘤細胞球和非侵入性腫瘤細胞球。細胞培養之實驗結果透過共聚焦成像結果顯示，在此共培養模型中，與腫瘤血管生成相關的血管百分比面積和總血管長度在共培養 6 天後都有增加。我們並且利用此模型來進行抗腫瘤血管新生藥物測試。上述結果顯示，此裝置提供了一種簡單且高效的細胞球體生成和共培養方法，可用於共培養類胚狀體和腫瘤細胞球來作為抗腫瘤血管生成藥物測試，和具有用於其他需要三維細胞球體共培養應用之潛力。

In-vitro tumor angiogenesis models can be used for studying the mechanisms of tumor angiogenesis and testing anti-tumor-angiogenesis drugs. Co-culturing of embryoid bodies (EBs) and tumor spheroids (TSs) allow mimicking tumor angiogenesis in-vitro. Here, we report a microfluidic hanging drop-based spheroid co-culture device (μ -CCD) that permits the generation and co-culturing of EBs and TSs using a simple manual operation procedure and setup. In brief, uniform-sized EBs and TSs can be generated on the device in eight pairs of hanging droplets from adjacent microfluidic channels, followed by the confrontation of EB and TS pairs by merging the droplet pairs to culture the EB-TS spheroids to investigate tumor induced angiogenic sprouting. The physical parameters of the device were optimized to maintain the long-term stability of hanging droplets for up to ten days. Mouse embryonic stem cell line ES-D3, and breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 cells were used to generate EBs, invasive TSs, and non-invasive TSs respectively. The confocal imaging results showed that the vessel percentage area and total vessel

length which are linked to tumor-angiogenesis, all increased after 6-days of co-culturing. An anti-angiogenesis drug testing on the co-cultured EB-TS spheroids was also demonstrated in the device. The above results show that the μ -CCD can provide a simple yet high-efficiency method to generate and co-culture cell spheroids may also be useful for other applications involving spheroid co-culturing.

一、前言

腫瘤血管新生是造成腫瘤生長與癌症轉移的主要原因之一，利用可模擬體內腫瘤微環境的體外細胞培養模型進行腫瘤血管生成實驗和抗血管新生藥物測試，可以加速相關治療之發展⁽¹⁾。近年來已有一些微流體晶片被發展來用於培養三維腫瘤細胞球體體外模型，用以了解生長因子、血管生成促進和抑制等分子如何影響腫瘤血管新生。這些包括可以生成纖維細胞相關的腫瘤微環境，以用於探測各種基質細胞在血管網絡狀腫瘤中的作用，和進行血管生成的信號通路分析的微流體晶片平台⁽²⁾，可共培養人臍靜脈內皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 和腫瘤細胞球體的微流體體外腫瘤微環境模型⁽³⁾，以及結合 U 形底 96 孔板盤和微流道的裝置，可用於共培養三維腫瘤細胞球體和人臍靜脈內皮細胞以研究腫瘤誘導血管新生⁽⁴⁾。上述體外模型是使用三維腫瘤細胞球體與其他非細胞球體的細胞共培養來進行共培養以模擬腫瘤血管新生之微環境，為了更進一步增加體外微流體晶片模型之仿生性，我們發展了第一個三微細胞球體共培養裝置，該裝置可以精確控制實驗條件來生成兩種三維細胞球體和進行共培養，透過共培養類胚狀體和腫瘤細胞球體這兩種不同細胞類型來誘導血管在腫瘤球體中新生，以作為腫瘤血管新生研究與藥物測試。此裝置之設計是在裝置上層含有有兩個相鄰的微流道，每一組通道可以再一次操作下產生八個懸吊液珠，每個懸吊液珠內可以生成一個三維細胞球體。此兩組微流道可以分別用來生成類胚狀體 (EB) 和腫瘤細胞球體這兩種不同的三維細胞球體。在裝置的下層則含有另一個微流道，用於將上層不同流道內的懸吊液滴合併形成一個懸吊液珠，讓原本液滴中的類胚胎體與和腫瘤細胞球體可以有物理性的接觸。此過程只需要簡單的手動操作，並且可在 15 秒內完成。我們使用小鼠胚胎幹細胞和人類 MDA-MB-231 和 MCF-7 乳腺癌細胞來進行球體生成實驗以展示此晶片技術之功能。

二、實驗所使用之材料與方法

1. 微流體晶片設計與製作

此微流體裝置是使用 SOLIDWORKS 軟體進行設計的。接著再利用電腦數控 (computer numerical control, CNC) 銑削機器 (Modela MDX-40 3-D, Roland DG Corporation, 日本) 切割 1.2 mm、2.0 mm 和 1.5 mm 厚度的聚苯乙烯 (polystyrene, PS) 片材料，以形成具有結構之聚苯乙烯。接著再將這些加工的聚苯乙烯片利用使用雷射切割機 (Flux Inc., 臺灣) 切割的雙面膠帶進行黏合，以完成微流體片裝置。此機械加工方式製作聚甲基丙烯酸甲酯 (polymethyl methacrylate, PMMA) 裝置支架。聚二甲基矽氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 裝置則是透過 PDMS 基質材料與交聯劑的混合 (比例為 10 : 1，形成之材料其楊氏係數約為 580 kPa⁽⁵⁾) 和透過使用 SU-8 基板模來製備。

2. 接觸角量測

氧離子和 Pluronic 處理過的 PS 材料表面靜態水接觸角測量，以及對 μ -CCD 裝置上懸吊液滴進行側面圖片拍照，是以光學方式進行。為了評估材料表面親水性，我們將 10 μ l 去離子 (deionized, DI) 水滴到表面上，然後使用解剖顯微鏡 (Nikon SMZ 1500, Nikon Inc., 日本) 拍攝影像。每次測量使用三個樣品，所有測量均一式三份進行。對於懸掛液滴測量，記錄了來自兩個不同設備的八個液滴。最後，我們使用 Image-J 軟體和低鍵軸對稱液滴形狀分析插件 (Stalder, 2005) 來計算每個 μ -CCD 液滴的接觸角。

3. 細胞培養

細胞培養皿中培養小鼠胚胎幹細胞 (mouse embryonic stem cell, mESC (ES-D3 細胞, CRC, 臺灣))、人類 MDA-MB-231 和 MCF-7 乳腺癌細胞 (臺灣生物資源收集和研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC, Taiwan))。mESC 是在含有 15% (v/v) 胎牛血清 (FBS) (SH30070, Thermo HyClone, MA, USA)、1% (v/v) 非必需胺基酸 (Gibco Invitrogen Co., MA, USA)、1% (v/v) L-麩醯胺酸 (Gibco Invitrogen)、0.1 mM 2-巰基乙醇 (Gibco Invitrogen)、和 2,000 U/ml ESGRO (ESG1107, Minipore, 美國) 的 DMEM 培養基中於小鼠胚胎纖維細胞飼養層上在 37 °C、5% CO₂ 的加濕培養箱中的培養基中培養。人類 MDA-MB-231 和 MCF-7 細胞在含有 10% (v/v) FBS (Millipore)、5% CO₂ 的 DMEM 培養基中於 37 °C 培養。當細胞系達到 80% 密集度時進行細胞繼代。我們使用膠原蛋白酶 IV (Gibco Invitrogen) 從將培養的 ES 細胞自其附著的小鼠胚胎纖維母細胞表面分離，然後再使用 TrypLE (Gibco Invitrogen) 將 ES 細胞解離成單細胞製成細胞懸浮液來注入晶片。在所有實驗之前，每個 μ -CCD 裝置均以 PluronicTM F-127 處理 24 小時，然後進行紫外線照射，之後將晶片置於 37 °C 環境下保存以保持其表面親水性。MDA-MB-231 和 MCF-7 細胞是使用 0.2% 胰蛋白酶、0.05% EDTA (Gibco Invitrogen) 來進行細胞解離，最後製備成含有 0.05% 甲基纖維素的細胞懸浮液 (細胞密度為 3×10^5 cell/ml) 來注入微流體通道中。在晶片中培養時每兩天更換一次細胞培養液。

4. 活體螢光顯微照相

我們使用含有 10 μ M 的長期細胞追蹤染料 CMFDA (Molecular Probes, 美國) 的 DMEM 在晶片上對腫瘤細胞球進行 60 分鐘之染色，之後再用培養基清洗流道 3 次，已移除染劑。之後再使用 Nikon Eclipse Ti-2 倒立式螢光顯微鏡 (Nikon, Japan) 來觀察腫瘤細胞球。

5. 藥物測試

Sunitinib 是一項 FDA 核准的抗血管新生藥物，我們製備溶解在二甲基亞 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 中濃度為 5 μ M、10 μ M 和 50 μ M 的 Sunitinib 溶液，並且將其儲存在 -20 °C 冰箱中。在每次實驗之前，將所儲備之溶液解凍並添加到 DMEM 培養基中來準備最終濃度為 0.5 μ M、1 μ M 和 5 μ M 的含藥培養基。不論藥物濃度為何，所有含藥培養基中的 DMSO 濃度均為 0.01% (v/v)。所有的藥效測試實驗都是在細胞實驗第 4 天將含藥物的培養基注入 μ -CCD 裝置中，然後繼續共培養 6 天。之後在第 7 天和第 10 天收穫球體進行共聚焦成像來評估血管生成，以及利用西方點墨法分析 CD31 表現。

6. 共軛焦顯微鏡拍照之細胞樣本準備

為了評估 EB 和 EB@TS 球體中的血管生成結果，EB 和 EB@TS 球體在第 7 天和第 10 天會從 96 孔盤和 μ -CCD 裝置中收集出來並且進行免疫螢光染色。 μ -CCD 裝置中球體收集是透過將過量的 1×PBS 溶液注入晶片中史地液滴破裂滴入培養皿中。接下來使用移液器 (使用 1000 μ l 移液器吸頭) 小心收集球體，然後將其重新置備於 1×PBS 溶液放入 15 mL 管中離心後去除上清液。接下來使用含有 4% (w/v) 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 的 1×PBS 溶液浸泡球體 30 分鐘將其固定，之後再將其重新懸浮在 1×PBST (0.1% (v/v) Tween20) 溶液中以及離心 3 次，以去除 PFA。我們使用 0.5% (v/v) Triton X-100 (在 1XPBS 中) 進行細胞膜通透化，並且在之後使用 PBST 溶液沖洗細胞 3 次以去除離心管中的界面活性劑。為了防止非特異性結合，我們將球體重新懸浮於含 5% (w/v) BSA 的 PBS 溶液中，並將其隔夜置放在 4 °C 冰箱。CD31 單株抗體 (ab222783, Abcam, 美國) 是置備在含 0.05% (v/v) Triton X100 和 5% BSA 之 PBS 溶液中，然後與球體在 4 °C 進行隔夜的作用。之後將此含抗體之溶液以 1×PBST 置換，在搖床上以 40 rpm 的速度洗滌 30 分鐘以從培養基中移除 Ab。細胞球體接著與含有稀釋至 1:200 (v/v) 比例二抗 Alexa Fluor® 647 (ab150075, Abcam, USA)，和稀釋至 1:500 (v/v) 比例藍色螢光核特異性染料 Hoechst 之溶液，在搖床上以 40 rpm 的速度在室溫環境反應 5 小時。在染色後以 1×PBST 溶液洗滌細胞球體 3 次，最後將球體重懸於 1×PBS 溶液中在 4 °C 環境中用鋁箔紙覆蓋保存。在共軛焦顯微鏡拍照之前我們使用移液管收集球體並放置在含有 35 毫米厚度玻璃底的細胞培養皿上 (α -plus, 臺灣)，將細胞球以 2 μ l 榮度的 Fluoromont™ 固定液 (Sigma, 德國) 覆蓋後置於細胞操作台內過夜乾燥。

7. 共軛焦顯微鏡照相與影像分析

我們使用帶有 SP5-II 模組的 Leica 共軛焦掃描儀進行共軛焦成像。鏡頭採用 20X 乾物鏡 (HC PL APO20X/0.70 PH2) 和 40X 油鏡 (HCX PL APO 40X/1.25 PH3) 進行影像擷取。在螢光探針之選用與激發光源方面，我們使用 1 mW HeNe 492 nm 波段雷射光激發 5-氯甲基螢光素二乙酸酯 (CMFDA) 螢光探針，使用氬雷射產生的 405 nm 波長光進行激發發射藍色螢光之 Hoechst 螢光探針，以及使用 10 mW HeNe 雷射的 650 nm 波段光激發 Alexa Fluor® 647 螢光探針。顯微鏡之增益、強度和針孔設定分別為 536–743 V、24% 和 1.00 Au。為了定量評估生成微血管網絡面積和長度，我們使用計算分析軟體 AngioTool 來分析血管網絡面積、血管長度、連接處和空隙度。這項軟體使用高斯濾波器進行血管識別，並使用基於 Hessian 的增強濾波器進行微血管段落之分割⁽⁶⁾。

8. 統計分析

所有分析皆為至少 4 次獨立實驗所得之結果，並利用單因子變異數分析 (one-way ANOVA) 和雙向變異數分析 (Tukey) 檢定以用於配對比較。所使用之軟體為 Origin Pro (OriginLab, 美國)。數值則是以平均值 (mean) $\pm$ 標準差 (standard deviation) 之方式呈現。分析結果具有統計學上之差異，是以 $p \leq 0.05$ 來判定。

三、實驗結果

1. 晶片之設計與操作

此晶片具有兩個相鄰之微流道，每個微流道的底部有八個開孔，與另一個微流道之八個開口併排。在這兩個流道的下層，含有一個微流道，可以透過加入液體讓其上方之兩組懸吊液滴自其開孔溢出而合併成一個新的液滴，讓原來分別處於兩個液滴中的細胞球沉降到新成的液滴中的底部形成兩個細胞的物理性接觸。如圖 1 所示，此微流控共培養裝置 (μ -CCD) 有兩層具有微流道結構和一層具有水庫結構的 PS 層相互組裝而成。如圖 1(a) 所示，每一個微流道有 8 個圓形孔可生成八個懸吊液珠，其下方之合併層 (將相鄰通道的液滴附著在一起) 則有 8 個對應的橢圓形孔。在各層的角落設有孔洞，來方便 PS 層組裝時能夠將各層對準。為了減少液體在培養過程當中的蒸發， μ -CCD 是放置在一個底部含有 10 ml 1xPBS 溶液的 100 mm 細胞培養皿 (Gene DireX™ Inc.，美國) 中。我們額外製作了一個 PMMA 裝置支架，將 μ -CCD 架高以防止液滴與培養皿底部 PBS 溶液碰觸。(圖 1(c))。此外為了我們也在支架兩側添加 PDMS 層 (12×18×3 mm) 來增加 μ -CCD 裝置和 PMMA 支架 (20×80×3 mm) 之間的摩擦力，以避免裝置在操作過程中滑動。

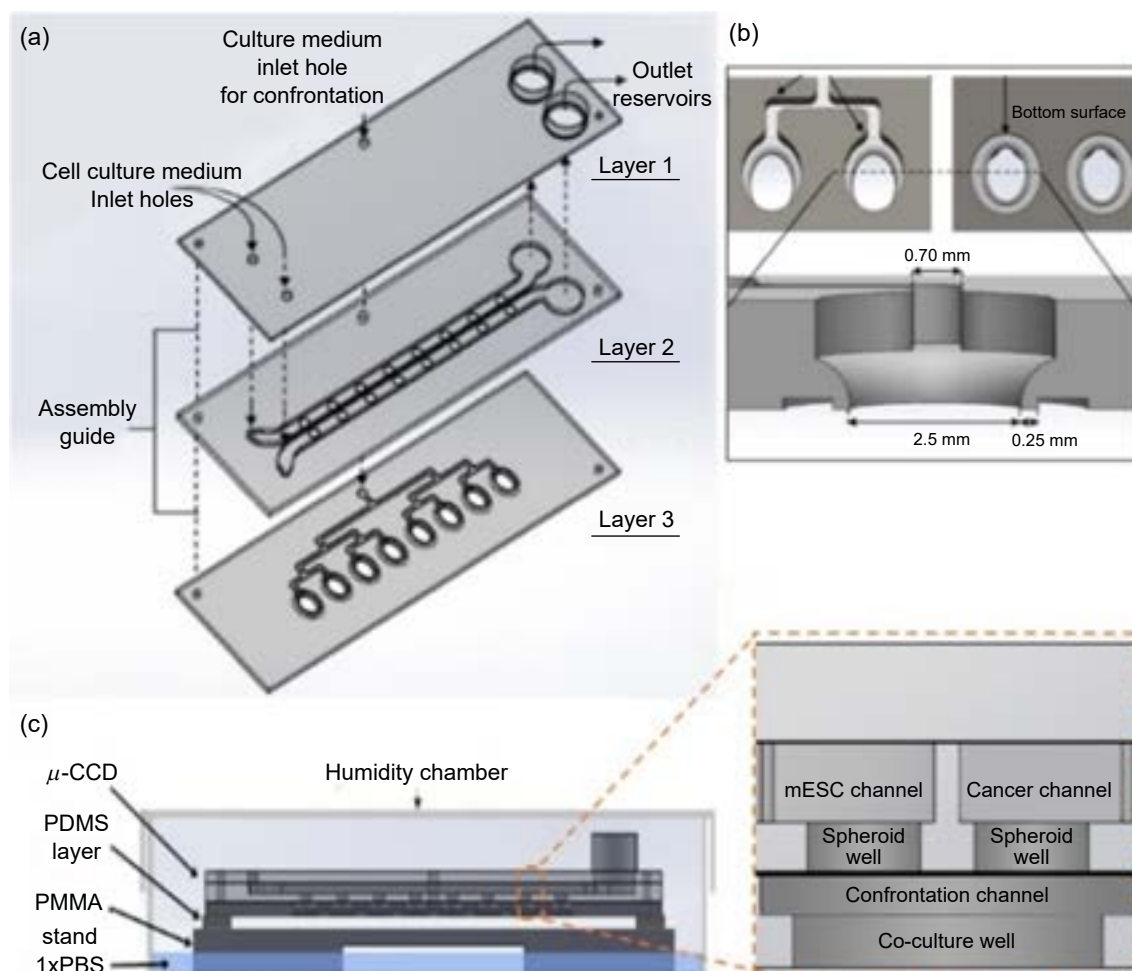


圖 1. μ -CCD 裝置之設計。(a) 三維爆炸圖 (b) 合併流道之上視圖與側視圖，(c) μ -CCD 裝置架設於保濕裝置內之側視圖，以及 (d) 其局部放大圖。

2. 裝置操作與細胞球體共培養

為了增加流道內部表面的親水性以易於培養液體在流道之操作，我們對流道內部表面施予電漿氧離子和 Pluronic 溶液之處理過後。結果顯示 PS 材料表面在其靜態水接觸角角度可以穩定的維持在 $20 \pm 3^\circ$ 達十天之久。裝置的操作步驟及實驗步驟之時間線的示意圖如圖 2 所示。首先將 2×10^4 細胞 / ml 濃度之 embryonic stem cell (ESC) 細胞懸浮液注入 μ -CCD 裝置的幹細胞培養流道 (圖 2(a)) 中。如圖 2(b) 所示，在注入後細胞懸浮液之後，將裝置靜置 15 分鐘可以讓細胞沉降至懸吊液滴底部聚集。之後利用培養液沖洗流道 3 次以除去為沉降於液滴中之多餘的細胞。在將 ESC 細胞於裝置中培養兩天之後 (此時 ESC 細胞已生成 EB)，將 3×10^5 細胞 / ml 濃度的癌細胞懸浮液注入裝置中的癌細胞培養流道，接著將癌細胞在裝置中培養兩天以形成腫瘤細胞球 (tumor spheroid, TS)。之後透過將新鮮培養液注入合併流道再將幹細胞培養流道和癌細胞培養流道的八組懸吊液珠合併，形成八對 EB 和 TS 細胞球體的物理系接觸以進行後續的 EB 與 TS 球體共培養。

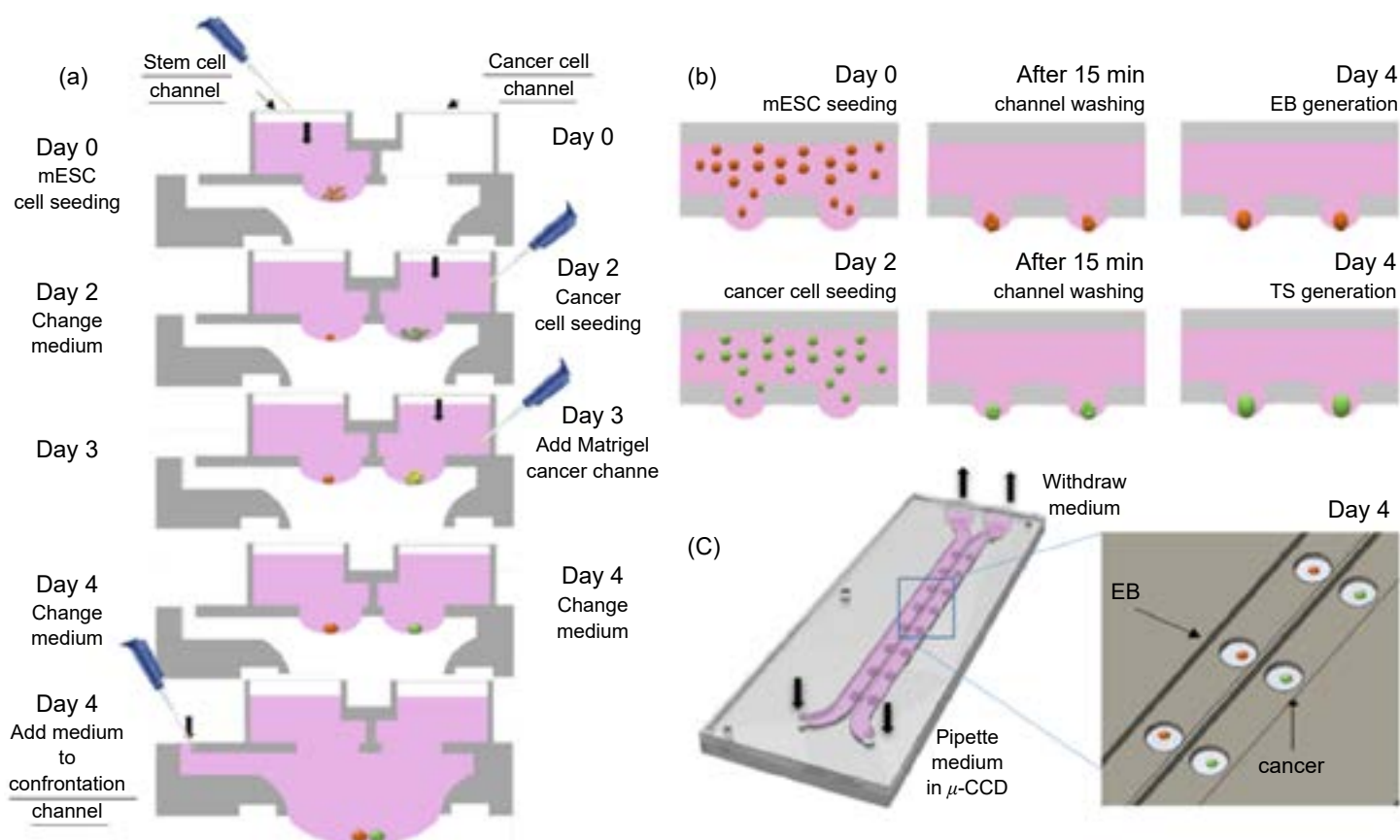


圖 2. μ -CCD 裝置操作步驟示意圖。(a) 短邊側視圖 (b) 長邊側視圖 (c) 裝置之三維示意圖。

要讓原本分別在不同流道的懸吊液滴中培養的 EB 與 TS 兩種細胞球形成物理性接觸和進一步共培養，我們將培養液注入合併流道來碰觸到其上層的兩個懸吊液滴，已在裝置底部形成一個較大尺寸懸掛液滴。之後 EB 與 TS 球體就會沉降至此新形成的懸掛液滴。我們透過用含有食用色素的蒸餾水注入合併流道來展示液滴合併和產生溪的一個液滴的過程與結果 (如圖 3 所示)。

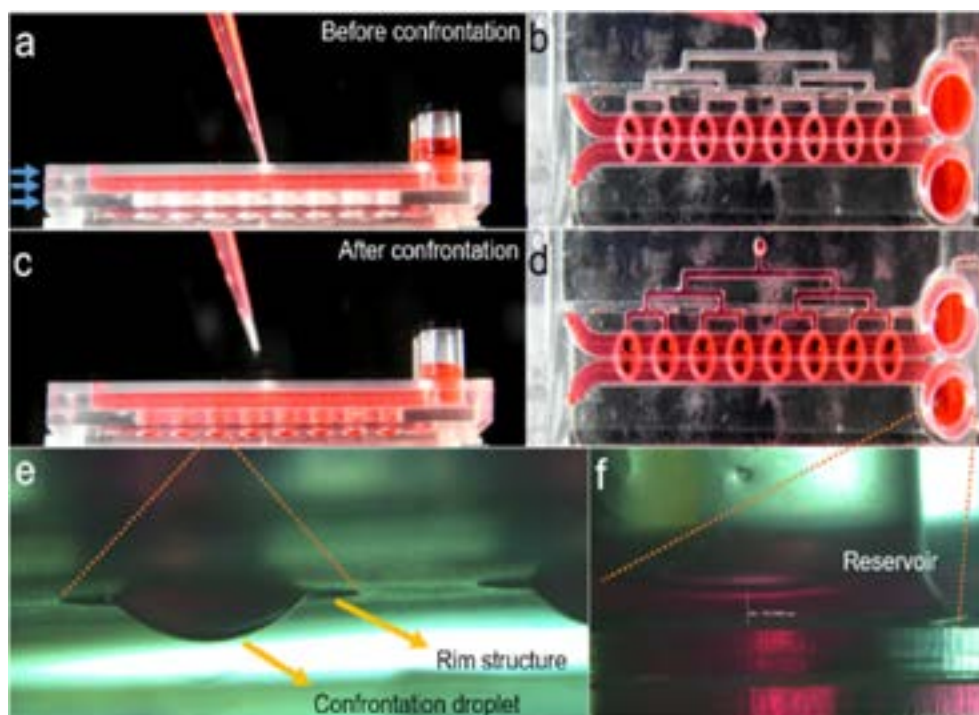


圖 3. 以注入紅色染料容液之裝置展現懸吊液滴合併之操作步驟與結果。(a)-(b) 懸吊液滴未合併以前之側視照片與俯視照片，(c)-(d) 懸吊液滴合併以後之側視照片與俯視照片，(e) 懸吊液滴合併所形成之液滴側視照片，以及 (f) 測視照片顯示合併後水庫內水位降低。

圖 4 為液滴合併前以及合併後的不同時間點所拍攝之細胞球，顯示細胞球在液珠合併後慢慢沉降並且滑向新形成液滴之中心位置且最終形成接觸，整個過程歷時約 15 秒。

3. 裝置內之細胞球體生成

在晶片上對於所培養之 EB 和 TS 瘤球體連續四天的觀察如圖 5(a) 所示。培養 EB 所使用的初始 ESC 細胞懸浮液濃度為 2×10^4 細胞 / ml，而培養 TS 所使用的細胞初始濃度為 3×10^5 細胞 / ml。當 ESC 以 2×10^4 細胞 / ml 濃度注入流道時，使用 ImageJ 軟體計算得知每個液滴內之初始細胞數目 191 ± 21 個 (圖 5(c))。癌細胞球培養是在 ESC 開始培養第 2 天後才開始，此時經過兩天培養的 ESC 細胞已生長成直徑 $160 \pm 13 \mu\text{m}$ 的 EB。我們在 EB 培養四天 (此時 TS 培養兩天) 後繼續進行 EB 和 TS 細胞球共培養。此時 EB、MCF-7 和 MDA-MB-231 細胞球體的直徑分別為 $272 \pm 26 \mu\text{m}$ 、 $440 \pm 20 \mu\text{m}$ 和 $285 \pm 23 \mu\text{m}$ 。從開始培養 ESC，MCF-7 癌細胞到後續的 EB 和 TS 共培養實驗結束的十天過當中，EB 和 MCF-7 球體的尺寸在此過程中不斷增加，最終直徑分別達到 $466 \pm 43 \mu\text{m}$ 和 $730 \pm 27 \mu\text{m}$ 。而在 ESC 與 MDA-MB-231 癌細胞共培養時，MDA-MB-231 球體直徑在第 7 天和第 10 天則分別為 $353 \pm 20 \mu\text{m}$ 和 $317 \pm 30 \mu\text{m}$ 。

4. 抗血管新生藥物測試

在將 EB 與 TS 共培養後可以看到腫瘤細胞球 TS 內的血管化 (如圖 6(a) 和 6(b) 所示)。在加入藥物的實驗組當中，雖然在第 7 天可以觀察到些微的血管網路生成 (圖 6(c))，但在

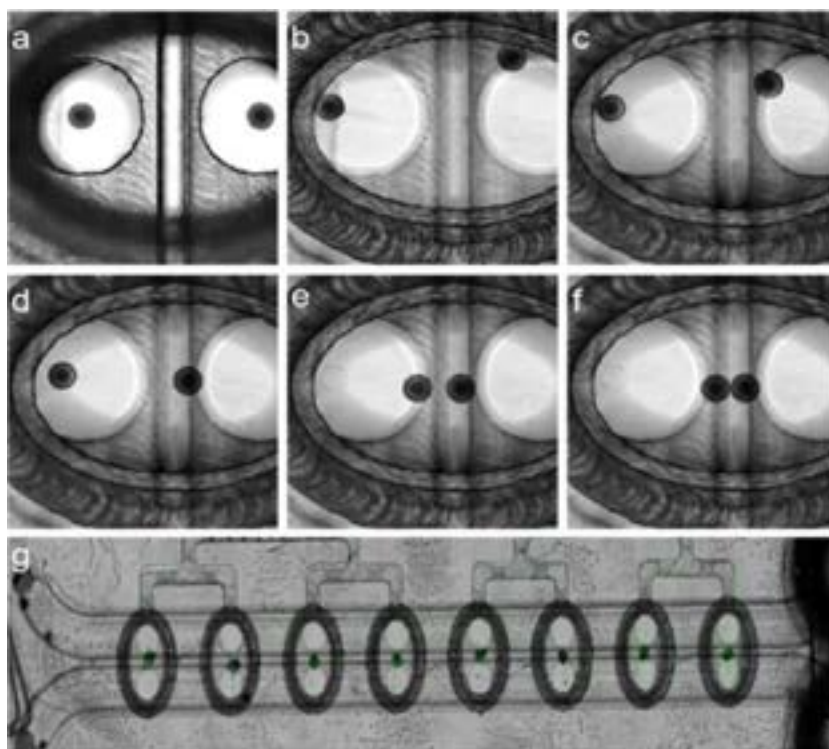


圖 4. 細胞球合併過程之顯微照片。(a) 液滴合併前，(b) 當注入 $200\ \mu\text{l}$ 的培養液於合併流道所形成的合併懸吊液滴弧度較小，兩個細胞球較難集中至液滴中心位置，(c)-(d)-(e)-(f) 當注入 $450\ \mu\text{l}$ 的培養液於合併流道所形成的合併懸吊液滴弧度較大，兩個細胞球可以在 15 秒的時間集中至液滴中心位置，(f) 形成物理性接觸之兩個細胞球，(g) 白光以及綠螢光合併照片顯示八對有物理性接觸的 EB 和 MCF-7 形成的 TS 細胞球 (照片中帶有綠色螢光的是 MCF-7 細胞)。

第 10 天可以觀察到血管網絡急劇減少 (圖 6(d))。此外，如圖 6(d) 和圖 6(e)-(i) 所示，在給予抗血管生成藥物 10 天之後，腫瘤球體逐漸呈破裂的型態。為了量化所生成之血管網絡，我們使用共軛焦顯微鏡拍攝對被 TRITC (紅色) 螢光染劑染色 CD31 的細胞球進行拍攝與定量分析。結果發現，腫瘤球當中之生成總血管長度和血管百分比面積在實驗地第 10 天有所增加，但在有施予藥物的實驗組當中，所生成之血管面積、血管總長度、血管百分比面積和血管分支指數在第 7 天和第 10 天有所下降 (圖 6(e)-(h))。

四、結論

三維細胞球共培養系統能模擬複雜的生理條件，對於建立體外疾病與生理模型至關重要。目前三維細胞球體之共培養需要在 96 孔盤或懸掛液滴中預培養球體，然後再手動收穫和轉移到另外的裝置，其過程不但耗時並且存在造成細胞傷害以及實驗再現性不佳的問題。

此論文所報導的懸吊液滴新型微流體三維細胞球共培養裝置 (μ -CCD)，可以透過簡易的操作步驟，來控制懸吊液滴以用於三維細胞球體之生成與操作。此研究結果顯示，利用 μ -CCD 方式進行實驗，可以形成大小均勻的細胞球體，並且避免使用傳統懸滴球體培養方

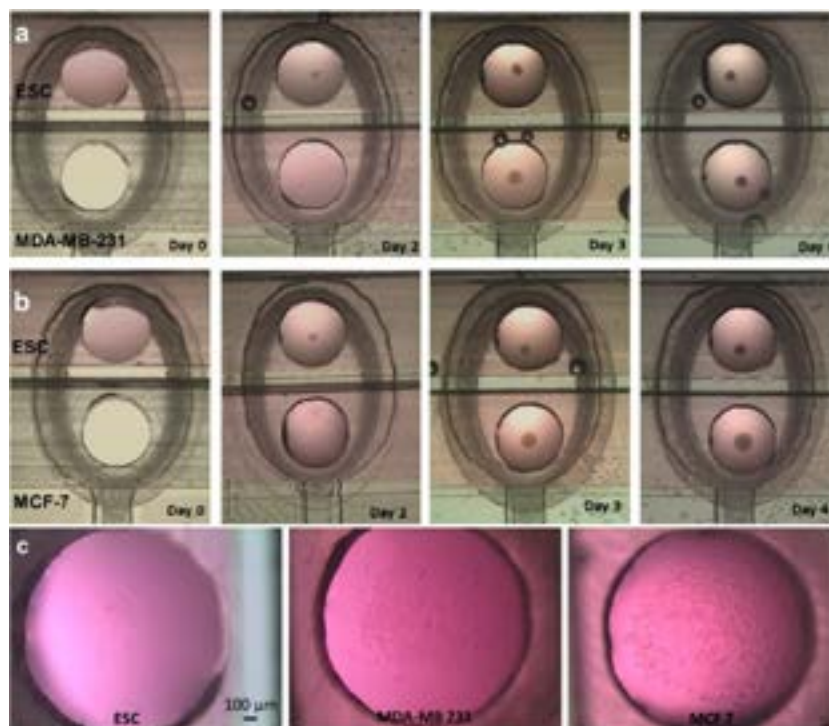


圖 5. 用 ESC、MCF-7 和 MDA-MB-231 細胞培養生成之三維細胞球體在不同時間點所拍攝之顯微照片: (a) ESC 形成之 EB 和 MDA-MB-231 細胞形成之 TS, (b) ESC 形成之 EB 和 MCF-7 細胞形成之 TS, (a)-(b) 照片中之比例尺 = 1000 μm 。 (c) 沉降在液滴底部但尚未形成三為球體前的 ESC, MDA-MB-231 和 MCF-7 細胞, 照片中之比例尺 = 100 μm 。

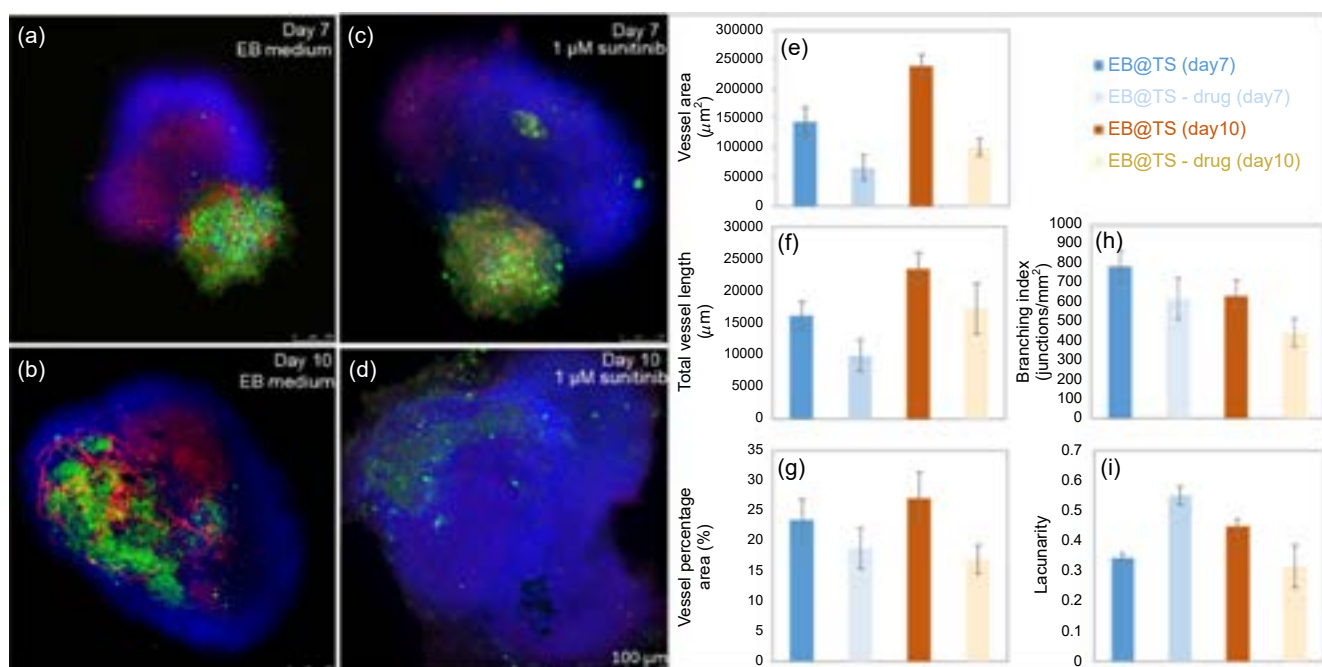


圖 6. 使用 EB 和 MDA-MB-231 形成的 TS 進行腫瘤血管生成以及藥物測試實驗結果。(a)、(c) 在培養第七與 (b)、(d) 第十天利用共軛焦顯微鏡拍攝之照片。(e)-(i) 量化呈現之 (e) 血管面積, (f) 血管總長度, (g) 血管百分比面積, (h) 血管分支指數, 和 (i) 血管空隙性。

法時繁瑣且不容易控制的手動操作^(7, 8)，因此可以簡化操作並提高球體共培養實驗的成功率。透過使用小鼠胚胎幹細胞 (ES-D3) 和乳腺癌細胞 (MDA-MB-231) 所形成的類胚胎體和腫瘤細胞球體來進行共培養，本研究展示了可以利用這項裝置進行腫瘤血管生成模型和其抗血管生成藥物測試之可行性。此 μ -CCD 裝置除了可以用在體外腫瘤誘導的血管生成研究的實驗以外，也可用於其他包括腦科學以及癌症⁽⁹⁻¹¹⁾ 等需要進行三維細胞球體共培養實驗之研究。

參考文獻

1. Weis SM, Cheresh DA, *Nature Medicine*, **17** (11), 1359 (2011).
2. Lee SW, Kwak HS, Kang M-H, Park Y-Y, Jeong GS, *Scientific Reports*, **8** (1), 2365 (2018).
3. Wang HF, Ran R, Liu Y, Hui Y, Zeng B, Chen D, Weitz DA, Zhao CX, *ACS Nano*, **12** (11), 11600 (2018).
4. Ko J, Ahn J, Kim S, Lee Y, Lee J, Park D, Jeon NL, *Lab on a Chip*, **19** (17), 2822 (2019).
5. Park JY, Morgan M, Sachs AN, Samorezov J, Teller R, Shen Y, Pienta KJ, Takayama S: *Microfluid Nanofluid*, **8** (2), 263 (2010).
6. Zudaire E, Gambardella L, Kurcz C, Vermeren S, *Plos One*, **6** (11), e27385 (2011).
7. Wartenberg M, Donmez F, Ling FC, Acker H, Hescheler J, Sauer H, *FASEB J*, **15** (6), 995 (2001).
8. Wartenberg M, Finkensieper A, Hescheler J, Sauer H, *Methods Mol Biol*, **331**, 313 (2006).
9. Zhang YM, Hu QF, Pei YQ, Luo H, Wang ZX, Xu XX, Zhang Q, Dai JL, Wang QQ, Fan ZL et al., *Nat Commun*, **15** (1), 2024.
10. Ozguna A, Lombonia DJ, Aylsworth A, Macdonald A, Staines WA, Martina M, Schlossmacher MG, Tauskelai JS, Woulfe J, Variola F, *Mater Today Bio*, **5** (25), 100992 (2024).
11. Meng XL, Yao D, Imaizumi K, Chen XY, Kelley KW, Reis N, Thete MV, McKinney AA, Kulkarni S, Panagiotakos G et al., *Nature*, **622** (7982), 359 (2023).

作者簡介

羅明心博士為國家衛生研究院生醫工程與奈米醫學研究所博士後研究員。

Dr. Didem Rodoplu Solovchuk (羅明心) is a Postdoctoral Research Fellow in the Institute of Biomedical Engineering and Nanomedicine at National Health Research Institutes.

謝菲尼小姐為國家衛生研究院生醫工程與奈米醫學研究所研究助理。

Jefunnie Sierra Matahum (謝菲尼) was a research assistant in the Institute of Biomedical Engineering and Nanomedicine at National Health Research Institutes.

許佳賢博士為國家衛生研究院生醫工程與奈米醫學研究所研究員，以及國立清華大學奈米工程與微系統研究所和國立中興大學組織工程與再生醫學博士班學程合聘教授。

Dr. Chia-Hsien Hsu is a Principal Investigator in the Institute of Biomedical Engineering and Nanomedicine at National Health Research Institutes. He also holds joint faculty positions in the Institute of NanoEngineering and Microsystems of National Tsing Hua University, and in the Doctoral Program of Tissue Engineering and Regenerative Medicine at National Chung Hsing University.

用於藥物測試之灌流式三維細胞培養微流體晶片

Perfusion 3-D Cell Culture Microfluidic Chip for Drug Testing

吳旻憲

Min-Hsien Wu

能忠實地反映出藥物在人體反應的體外細胞測試模式，不僅能避免實驗動物的使用，這種仿生模式亦能節省藥物研究的時間和成本。為此，利用微流體晶片來進行灌流式三維細胞培養被認為具有潛力。本文章首先將提供一些背景資訊，其包含細胞培養在藥物研發的角色、灌流式三維細胞培養的意義、利用微流體技術來執行這種細胞培養的優缺點及建構這種細胞培養模式需考量的議題。最後，本文章將介紹一項簡單且易操作的灌流式三維細胞培養系統。

An in vitro cell culture model that can faithfully reflect the response of drugs in the human body not only avoids the use of experimental animals, but this biomimetic model can also save time and cost in drug research. To achieve this goal, the use of microfluidic chips for perfusion-based three-dimensional (3-D) cell culture is considered to have potential. This article will first provide some background information, including the role of cell culture in drug development, the significance of perfusion 3D cell culture, the advantages and disadvantages of using microfluidic technology to perform this type of cell culture, and the considerations for constructing this cell culture model. Finally, this article will introduce a simple and easy-to-operate microfluidic-based perfusion 3-D cell culture system.

一、細胞培養在藥物開發過程的角色

新藥的研發是一項漫長且成本高昂的過程，其主要涉及藥物發現、藥物開發及臨床試驗等重要階段。以新藥研發為例，在新藥研發的早期階段，生化分析模式通常用於快速篩選所謂的先導藥物化合物，然而，這種相對簡化測試模式所獲得的資訊，可能無法忠實地代表藥物化合物在複雜的生物系統中，其與藥物標的之間的實際作用情形。因此，細胞培養一般被用於細胞層面的藥物測試，以彌補簡化的生化測試模式和後續動物測試模式之間的差異。透過這種方式，可以排除具有細胞毒性或無功能的藥物化合物。除此之外，在使用實驗動物的所謂「三R」(減少、精緻化和替代)指導原則下，減少(甚至未來禁止)實驗動物的使用已是一項全球性的趨勢。除了倫理的考量之外，事實上，由於人類和實驗動物之間的物種差異

性，動物模型的研究結果可能無法充分代表人類對於藥物化合物的真實反應。為此，全世界各大藥廠無不積極地開發和驗證可靠的體外測試模式，來替代傳統的實驗動物模型。在各種可能的體外測試模式當中，體外細胞測試模式被認為具有前景。理想上，能忠實地反映出藥物在人體內反應的體外細胞測試模式，不僅能避免實驗動物的使用，這種仿生體外細胞測試模式亦能大幅節省藥物研究的時間和成本。

二、灌流式三維細胞培養的意義

細胞培養技術已被廣泛應用於生命科學或醫學相關的研究工作上。然而，傳統的細胞培養模式有其局限。傳統的細胞培養操作大多使用多孔微盤或培養皿作為細胞培養的容器，在這種模式下，細胞培養大多採用靜態式培養及二維單層式細胞培養。這種細胞培養方式有下列缺點：(1) 靜態式細胞培養需要周期性的培養液更換，這可能會造成相對不穩定的細胞培養環境 (圖 1)⁽¹⁾。在不穩定的培養條件下，實驗條件不易被精確地定量與控制，因而影響實驗結果的精確性。(2) 傳統的細胞培養操作常涉及周期性的培養液更換及其它人工操作過程。因此，實驗工作不但費時及費力，且可能因為實驗人員操作上的差異而影響實驗結果。(3) 傳統細胞培養大多採用二維單層式細胞培養，在此模式下，細胞貼附在細胞培養容器的底部表面生長。在這種情況下，細胞的型態及生理可能跟其在真實的生理狀態下有所不同。因此，利用此種細胞培養模式進行研究工作，其實驗結果可能會失去真實性。為了要創造一項能提供穩定(實驗條件易定量與控制)且相對仿生的細胞培養模式，灌流式三維細胞培養是一項不錯的選擇，其具有下述優點：(1) 灌流式三維細胞培養以連續式的方式，供給細胞新鮮的培養液，並同時移除細胞培養廢液，因此能提供相對穩定 (圖 1)⁽¹⁾、不易受污染且仿生的細胞培養環境。(2) 三維細胞培養是近年來受到重視的細胞培養方式，在三維的細胞培養環境下，生物細胞的型態及生理會更接近它們在真實生物體內的狀態。因此，以三維細胞培養來進行研究工作，其實驗結果會比較具有生理意義。

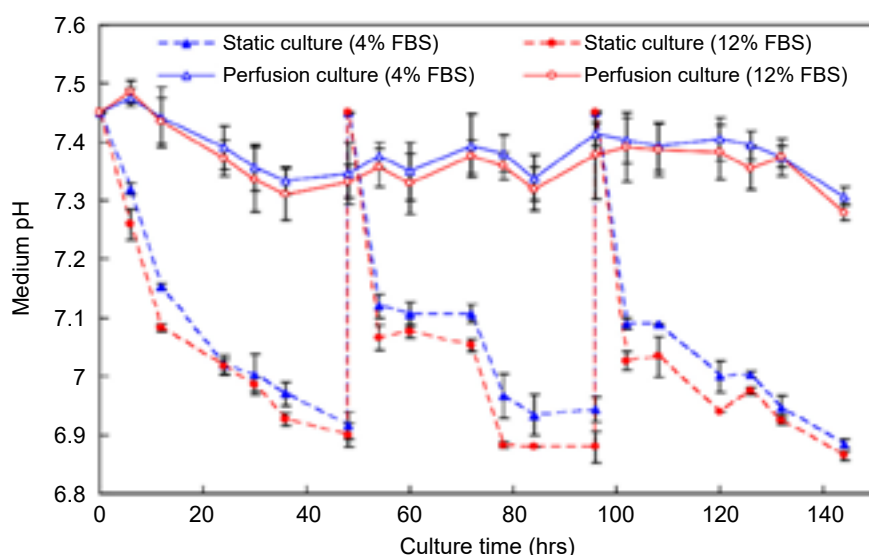


圖 1. 比較灌流式培養 (perfusion culture) 以及靜態式培養 (static culture) 環境中酸鹼值的波動情形。無論是在含 4% 牛血清 (FBS) 還是含 12% 牛血清的細胞培養中，可觀察到在灌流式培養下，環境的酸鹼值較為穩定均一；相對而言，在靜態式培養下，因為細胞培養液是藉由人工週期性的更換，使得培養環境中的酸鹼值相較波動較大⁽¹⁾。

三、利用微流體技術來執行灌流式三維細胞培養：優點與缺點

透過微流體技術，我們可以使用尺寸在數十到數百微米的微結構（例如：微管道或微型腔體）來操控微量（例如： 10^{-9} 至 10^{-18} 公升）的液體。在這種尺寸範圍內，微流體裝置特別適合用於細胞相關的研究工作，這是因為其中微結構的尺規與細胞的天然微環境相符⁽²⁾，這項特點使得微流體細胞培養晶片能提供相對仿生的細胞培養條件（圖 2）⁽³⁾。此外，由於微型化的特性，利用微流體生物晶片來進行細胞培養相關的研究工作，能大幅降低實驗資源（例如：細胞、培養液或藥物）的需求。這項特點對於藥物研究工作特別具有意義，因為在藥物研發的過程中，測試的藥物化合物或細胞的數量通常都非常有限。在另一方面，微流體系統的另一項物理特性是高表面積與體積比（surface to volume ratio），這意味著在微流體系統中，表面現象會變得相對明顯，例如氣體擴散及熱傳會變得更有效率，這項優點將有利於細胞培養過程中之氣體及溫度精確控制。

然而，上述的高表面積與體積比特性，亦可能造成微流體系統中一些物質（例如：蛋白質或藥物）的吸附現象變得明顯。大多數的微流體細胞培養晶片都是以聚二甲基矽氧烷（polydimethylsiloxane, PDMS）為材料來建構，PDMS 具有生物相容性、無毒、光學透明及高透氣性，因此這項材料特別適合用來製作微流體細胞培養晶片。然而，由於其疏水性的特性，PDMS 的表面容易發生非特異性的蛋白質吸附現象，這問題在細胞培養相關的研究工作上特別需要被關注，這是因為細胞培養液當中含有許多蛋白質（例如：來自血清或細胞分泌的蛋白質），這些蛋白質對於細胞的生理扮演一定的角色，而蛋白質的吸附可能會影響細胞的生理。除了蛋白質之外，PDMS 表面亦可能吸附一些藥物化合物，上述的表面吸附問題都可能影響藥物測試的準確性。而這些問題，可以透過 PDMS 表面處理（例如：Pluronic[®] 界面活性劑⁽⁴⁾）而獲得改善。除了物質吸附問題外，高表面積與體積比特性也容易造成液體（例如：細胞培養液）的蒸散現象，特別是在細胞培養所需之溫度條件（37 °C）之下。這現象會進而影響細胞培養液的條件（例如：測試藥物或養分濃度），而讓藥物測試工作變得不精確。這項基本的技術問題可以透過連續式的細胞培養液灌注或採用其它不透氣的材料來解決。

除了前述特性之外，由於微型化的因素，微流體系統的另一項特點是其流體的流動型態為層流（laminar flow）。在層流狀態下，在微流體系統中的物質傳遞（mass transfer）主要是依賴擴散（diffusion）現象。在微流體系統中，利用層流流動型態和擴散主導的物質傳遞現象，我們能夠在時間和空間上操縱物質（例如：藥物濃度）的分佈或梯度，這項特點是我們使用其它傳統細胞培養裝置所無法實現。基於這項技術特點，舉例來說，我們可以在微流體細胞培養系統中創造出擬研究的藥物濃度梯度，來測試細胞對於藥物濃度的反應，抑或是創造出具有特殊氣體、養分或其它物質分佈的仿生細胞培養微環境，再利用這類具有生理意義的仿生細胞培養模式來進行各項藥物測試工作。

四、仿生灌流式三維細胞培養晶片需考量的議題

為了忠實地探索人體細胞對於藥物的真實反應，在體外創造一項具有生理意義的仿生細胞培養模式為其關鍵。為了實現這目標，首先我們必須瞭解擬模擬組織（例如：某一種腫瘤組織）的生理資料，這些資料包含其 3D 組織之組成、該組織所處之特殊生化及生物物理微環境。就 3D 組織而言，我們必須瞭解其中所含的細胞種類與分佈及細胞外基質

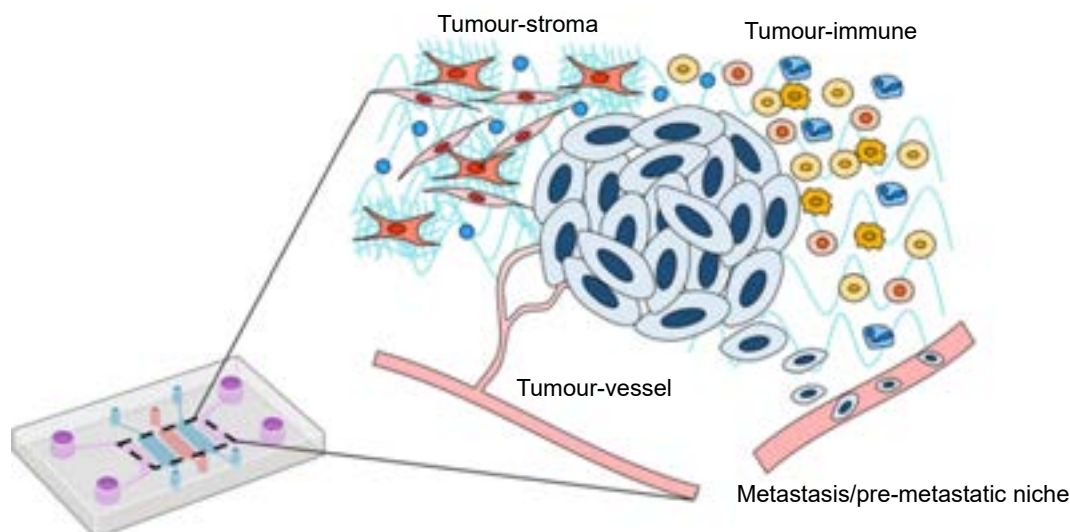


圖 2. 利用微流體細胞培養晶片能提供相對仿生的細胞培養環境來研究腫瘤微環境⁽³⁾。

(extracellular matrix, ECM) 的組成與分佈。另外，就生化微環境而言，我們必須瞭解擬模擬組織所處的重要生化微環境因子 (例如：養分、氣體、或生長因子之濃度梯度)。最後，就生物物理微環境而言，我們必須瞭解在正常生理條件下，擬模擬的組織所受到的物理刺激有哪些 (例如：流體剪切力或機械壓迫力刺激)。在充分瞭解上述生理資料後，整體而言，我們可以透過組織工程和生物材料的相關技術，在體外創造 (相對) 仿生的 3D 細胞培養結構物，來進行細胞培養及後續的藥物研究工作。其中，生物材料的選擇、製備或修飾扮演關鍵因素，生物材料不僅為細胞培養提供基礎的 3D 支架模板，而且還透過複雜的細胞－材料交互作用，給予細胞特殊的生物訊號而影響其細胞生理。另外，就測試細胞的來源議題，一般來說，使用人類細胞可以消除物種差異所造成之藥物測試結果偏差問題。然而，利用人類細胞進行藥物研究可能會受限於取得性問題。隨著幹細胞技術的發展，各種人類幹細胞 (可用於分化成所需要的細胞種類) 有望成為藥物研發過程中所需要之人類細胞來源。

另一方面，就生化或生物物理微環境而言，如前述我們可以透過微流體系統中，層流流體的特性及擴散主導的物質傳遞現象，我們可以在微流體系統內模仿生理相關的生化微環境。此外，透過特殊的微結構或制動機制設計，我們可以在微流體細胞培養系統中，精確地產生各種流體效應 (例如：流體剪切力) 或機械力刺激 (例如：機械壓迫力⁽⁵⁾ 或張應力⁽⁶⁾) 來創造一些重要的生物物理微環境。整體而言，上述的 3D 細胞培養模式及各項細胞培養微環境之建立，在細胞的生理上扮演重要的角色，這些都是實現仿生灌流式三維細胞培養晶片的成敗關鍵。

五、一項簡單且易操作的灌流式三維細胞培養系統

自從 2005 年以來，特別是在學術研究領域，各種微流體細胞培養系統被廣泛地提出，其近年的發展情形可參考相關領域之綜論性期刊論文⁽⁷⁻⁹⁾。就展示如何建構一項基本的灌流式三維細胞培養微流體系統而言，本文章將以我們先前開發的一項微流體系統 (稱之為 microCulture)⁽¹⁰⁾ 來舉例說明。該系統的開發主要結合細胞/組織培養及微流體生物晶片等相

關領域的知識及技術，旨在開發一項能提供穩定、均一、仿生、高通量化、低實驗資源需求及操作方便的高效率細胞培養工具。該系統的可能利基市場有：(1) 進行新藥研發的各大藥廠、(2) 進行細胞培養相關實驗之生命科學或醫學研究機構、以及 (3) 進行臨床醫療檢驗或個人化醫療評估之醫療機構。接下來，我們將以 microCulture 為例來說明如何建立一項用於灌流式三維細胞培養之微流體系統。microCulture 主要包含兩個部份：「微流體細胞培養晶片」及「電腦控制裝置」，該系統的整體外觀如圖 3 所示。在 microCulture 系統中，微流體細胞培養晶片被置放於電腦控制裝置之中心部位，微流體細胞培養晶片的下方則貼附著 ITO (indium tin oxide；銻錫氧化物) 溫控玻璃。此外，微流體細胞培養晶片以空氣氣管聯結電腦控制裝置上之負氣壓孔，用以同時驅動多管道的細胞培養液輸送。microCulture 系統內電腦控制裝置分別控制所輸出之氣壓 (包含壓力大小及頻率) 及電壓大小，以分別調控細胞培養液之輸送流量及細胞培養環境之溫度。以下就 microCulture 的各項設計進行說明：

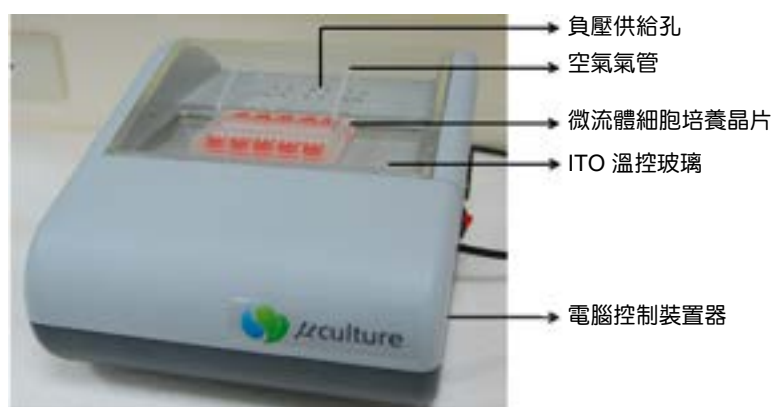


圖 3. 用於灌流式三維細胞培養之微流體系統 (microCulture) 之外觀照片⁽¹⁰⁾。

1. 微流體細胞培養晶片設計

微流體細胞培養晶片設計之上視圖及實際照片圖分別如圖 4(a) 及 (c) 所示。在設計上，每一細胞培養液槽體供給3個獨立之細胞培養微反應槽 [圖 4(b)]，此設計可使每一測試條件 (例如：藥物種類或濃度) 能進行三重複實驗。整體而言，本細胞培養晶片中共有 30 個細胞培養微反應槽，可用於測試10種不同的細胞培養條件。以下就每一組測試單元 [圖 4(b)] 的組成加以說明：(1) 細胞培養液輸入孔：配製完成之細胞培養液，可藉由 pipette tip 直接插在此輸入孔。(2) 細胞培養液槽體：細胞培養液從 pipette tip 流出後進入此槽體。(3) 細胞培養微反應槽：進行三維細胞培養的區域，細胞培養液經負氣壓源驅動後，會從細胞培養液槽體流經此處與生物細胞接觸。(4) 微流道：微流體細胞培養晶片內連通細胞培養液槽體、細胞培養微反應槽及細胞培養廢液槽的微細管道。(5) 細胞培養廢液槽：用以收集使用過的細胞培養液，細胞培養液與細胞接觸後會經由負氣壓源驅動而流至此收集槽。(6) 氣體微管道：本系統內將負氣壓槽內之負氣壓均勻傳送至各細胞培養單元的氣體微管道。(7) 負氣壓槽：本細胞培養晶片於此施加負氣壓源以同時驅動多管道 (30 個) 細胞培養液輸送。(8) 負壓孔：本細胞培養晶片利用此孔與電腦控制裝置以管路連接而施以負氣壓。

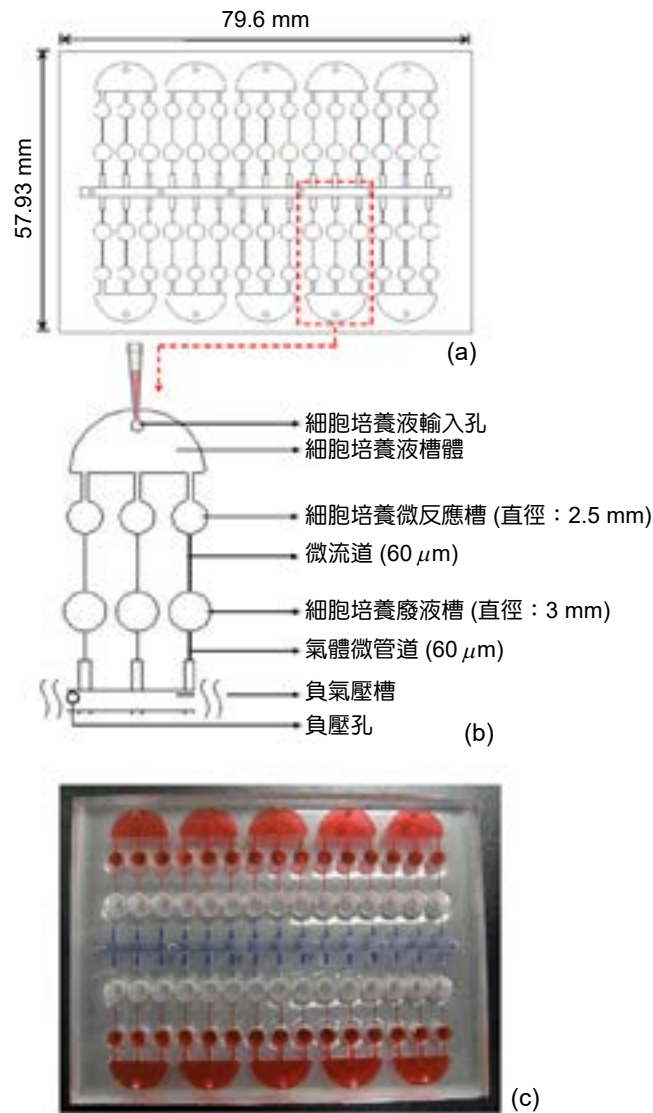


圖 4. 微流體細胞培養晶片：(a) 上視設計圖、(b) 細部架構圖及 (c) 實際照片圖⁽¹⁰⁾。

就結構而言，微流體細胞培養晶片之構成如圖五所示，其各結構層分別描述如下：(1) 流道層：以 PDMS 為材料製成，內部主要包含細胞培養液槽體、液體微流道、氣體微管道及負氣壓槽腔體。(2) 中介層：以 PDMS 為材料製成，內含許多中空腔體，此層用於接合「流道層」及「底層」。(3) 底層：以聚甲基丙烯酸甲酯 (polymethylmethacrylate, PMMA) 為材料製成，此層包括「細胞培養微反應槽」與「細胞培養廢液收集槽」兩模組，(如圖 5) 較外緣的中空圓柱體為用於裝載三維細胞膠體的腔體；內側的中空槽體為細胞培養廢液之收集槽體。

就一般細胞培養相關的研究工作而言，大部份的研究會收集細胞培養廢液以進行後續的生化分析，以探討細胞對於培養條件 (例如：藥物的添加) 的反應。然而以微流體裝置進行細胞培養時，因為培養液或細胞樣品的使用量較少，造成少量細胞培養廢液在收集上較為困難。為了解決這問題，本微流體細胞培養晶片的底層設計有細胞培養廢液收集槽模組，

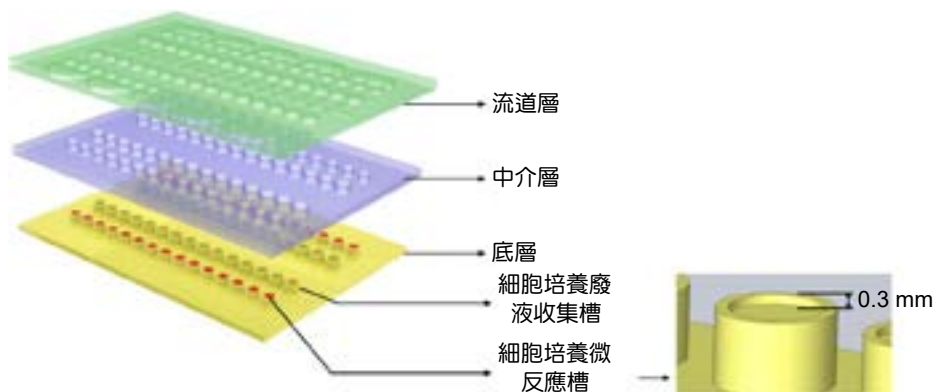


圖 5. 微流體細胞培養晶片之分層構成圖⁽¹⁰⁾。

此模組之陣列設計與市售多孔微盤內之凹槽陣列配置相同。在操作上，當細胞培養工作完成後，此細胞培養廢液收集槽模組 (如圖 5 底層) 可以被卸下，而直接利用多孔微盤讀取機 (microplate reader) 進行實驗結果分析 (其概念如圖 6 所示)。有別於其它微流體細胞培養裝置，microCulture 利用一般生化實驗室常有的多孔微盤讀取機來進行後續之高通量生化分析工作，這使得研究工作更加便利及有效率。

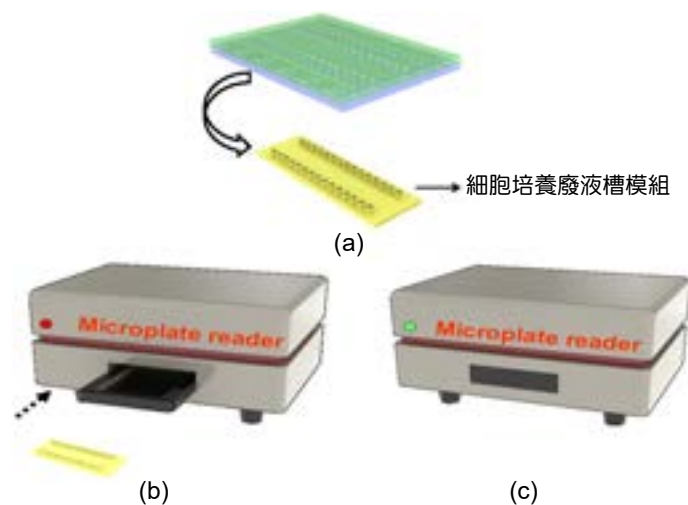


圖 6. (a) 微流體細胞培養晶片中之「細胞培養廢液收集槽模組」可直接從晶片上拆卸下來；(b)-(c) 由於收集槽模組陣列是針對多孔微盤讀取機所設計，因此在完成細胞培養測試後，可以直接以一般研究機構常有之多孔微盤讀取機 (microplate reader) 進行高通量生化分析⁽¹⁰⁾。

2. 利用負壓來驅動多管道之培養液輸送

microCulture 利用氣體負壓來同時驅動多管道之培養液輸送，來連續性地提供細胞新鮮培養液並同時移除培養液廢液。一般灌流式細胞培養操作上，常常利用注射式或蠕動式幫浦來輸送細胞培養液，因為這些市售的幫浦體積大且價格貴，因此可能限制其在高通量實驗工作上之使用 (例如：以細胞培養為基礎之藥物篩選)。針對這項議題，本項微流體細胞培養晶

片利用一負氣壓源來同時驅動多管道之培養液輸送。在操作上，微流體細胞培養晶片上之負壓孔用以連接負氣壓源 (圖 7 左側) 以同時驅動多管道 (30 組) 細胞培養液輸送。氣體負壓式細胞培養液之輸送機制如圖七所示，當微流體細胞培養晶片完成三維細胞培養樣品及細胞培養液之進樣後 [圖 7(a)]，負氣壓源藉由空氣氣管聯結至細胞培養晶片上之負壓孔並施予負氣壓 [圖 7(b)]，此時負氣壓槽之壓力會快速下降並同時驅動各微管道之培養液往前輸送經過細胞培養微反應槽 [圖 7(b)]，而最終至細胞培養廢液收集槽 [圖 7(c)]，最後細胞培養廢液則會被儲存於細胞培養廢液收集槽內 [圖 7(d)]。在培養液灌流控制上，使用者可由 microCulture 的電腦控制裝置來調控負氣壓源之大小及其作動頻率，來調控培養液灌流之流量。此簡易之細胞培養液體輸送方式，可大幅降低裝置成本及操作與控制上之技術需求，進而提升 microCulture 之實際應用性。

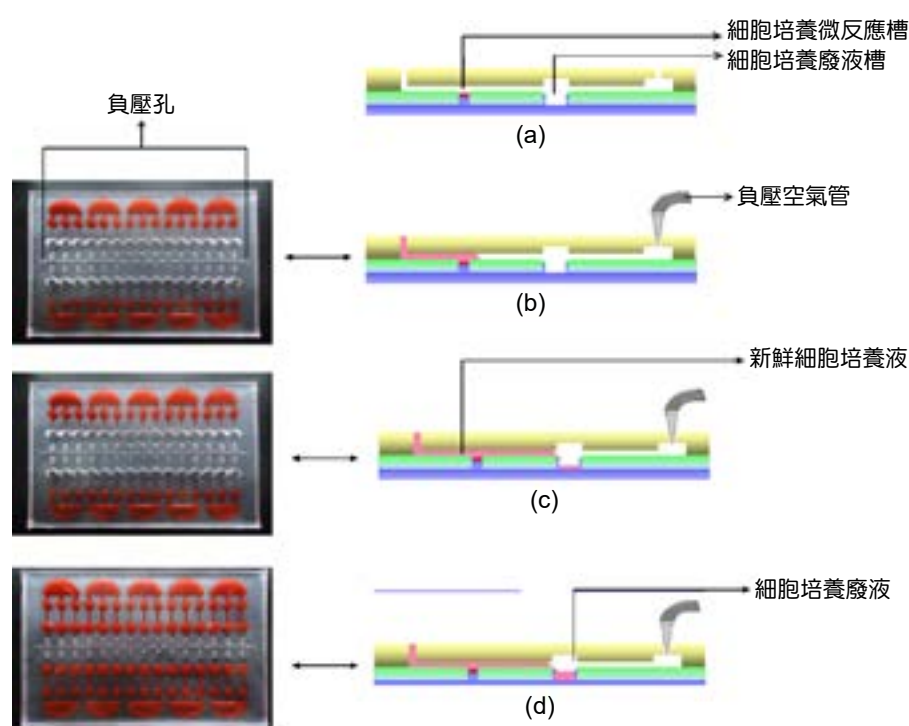


圖 7. 負壓氣動式培養液灌流機制：(a) 微流體細胞培養晶片完成三維細胞培養樣品及細胞培養液之進樣；(b)-(c) 負氣壓源藉由空氣氣管聯結至細胞培養晶片上之負壓孔以驅動培養液往前輸送經過細胞培養微反應槽；(d) 最後細胞培養廢液則會流至並儲存於細胞培養廢液收集槽內⁽¹⁰⁾。

3. 高效率三維細胞培養樣品進樣機制

利用微流體生物晶片來進行三維細胞培養的一項重要技術議題是細胞培養樣品的進樣問題。一般而言，三維細胞培養樣品 (例如：細胞懸浮液及生物材料的混合物) 因其黏稠特性而不易進行定量分注，特別是針對微量樣品的精確分注與進樣。為了以高效率及高精確性的方式來進行微量三維細胞樣品之定量及進樣，在細胞培養晶片之設計上，在結構之底層 (如圖 5 所示)，除了有前述之細胞培養廢液收集槽模組外，還有一「細胞培養微反應槽」模組。在細胞培養微反應槽模組上，有許多圓柱形單元體 (圖 5)，而三維細胞培養樣品進樣

機制之重點在於圓柱單元體頂部表面的凹槽設計 (如圖 5 右)，該凹槽用以裝載所進樣的三維細胞培養樣品 (既細胞懸浮液及生物材料的混合物)，如圖 5 (右) 所示，凹槽之深度為 0.3 mm，直徑 2.5 mm，我們透過這凹槽的體積來定量三維細胞培養樣品之體積。除此之外，此三維細胞培養樣品進樣機制亦包含一項「膠體分散平台」之設計，如圖 8(a) 所示，「膠體分散平台」為以 PMMA 材料所構成，而「膠體分散平台」內之中空單元部份，其尺規與細胞培養晶片底層之細胞培養微反應槽模組互相搭配。操作上，先將細胞培養晶片底層之「細胞培養微反應槽模組」與「膠體分散平台」內之中空單元部份對合 [圖 8(b)] 使之成為平面。接下來，將少量混有細胞之膠體懸浮液 (未凝膠狀態) 注於此平面上，再使用一平板物 (例如：玻璃平板)，以水平方向平均分佈所注入之膠體懸浮液，這操作使膠體懸浮液能均勻地注入每一個圓柱形單元體表面所設計之凹槽中 [圖 8(c) 標為紅色]，如此便可有效率且定量性地進樣許多三維細胞膠體單元。等待膠體凝膠成型後，再將「細胞培養微反應槽模組」與「膠體分散平台」分開 [圖 8(d)]，最後將裝載許多三維細胞膠體單元的細胞培養微反應槽模組與細胞培養晶片底層另一模組「細胞培養廢液收集槽模組」結合 [圖 8(e)]，接下來，就可與細胞培養晶片的其它層結構組合 [圖 8(e)-(g)]。利用此方式，操作者可進行高效率及高精確性之三維細胞培養樣品之進樣。

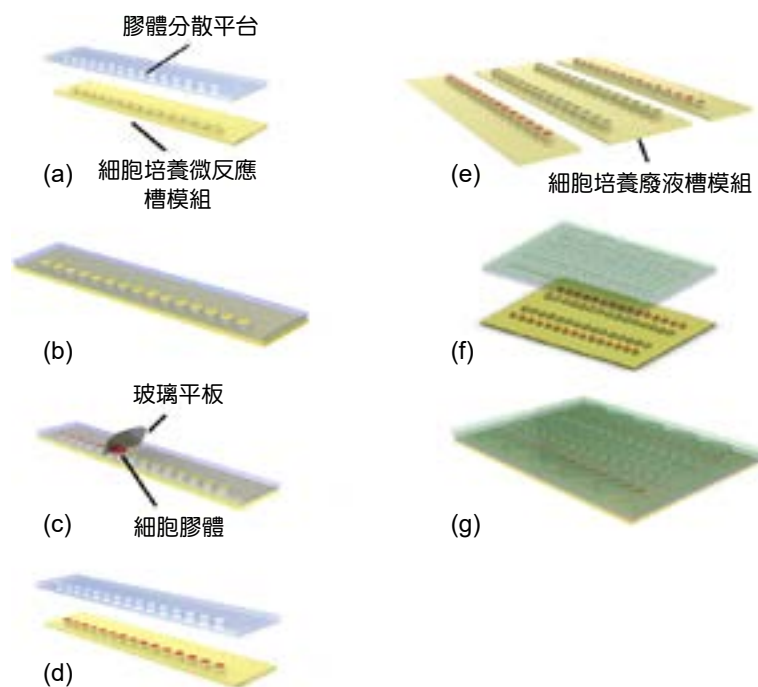


圖 8. 三維細胞培養樣品進樣機制：(a) 細胞培養微反應槽模組與「膠體分散平台」之圖示；(b) 將細胞培養微反應槽模組與「膠體分散平台」組合而形成一平面，此平面上露出許多可供細胞／膠體進樣之凹槽；(c) 將少量含有細胞之膠體懸浮液注於平面上，並使用一玻璃平板以水平方向刮抹，這操作使得細胞膠體均勻地進樣至細胞培養微反應槽模組上之凹槽；(d) 待細胞膠體進樣至凹槽後，將「膠體分散平台」拆除；(e)-(g) 將已裝載細胞膠體之細胞培養微反應槽模組與細胞培養廢液收集槽模組結合，並與晶片其它層結構組合，既完成三維細胞培養樣品之進樣操作⁽¹⁰⁾。

4. ITO 溫控玻璃模組

為了維持細胞培養溫度環境的穩定，於電腦控制裝置器內，microCulture 利用 ITO 玻璃 (規格：15 cm × 8 cm、厚度 0.7 mm、片電阻值 120 Ω) 來進行溫度控制，如圖 9 所示，ITO 玻璃是一種透明的導電材料，當電流通過時，其電阻效應會產生熱。本系統藉由回饋控制機制 (PID 恆溫控制器與溫度感測器) 穩定地輸出電壓於 ITO 玻璃，進而產生恆定的熱場。由於 ITO 玻璃的透明特性，放置於上方之微流體細胞培養晶片可直接以顯微鏡進行細胞觀察。相較於傳統細胞培養所使用的恆溫培養箱，整合了 ITO 玻璃及其溫控機制能提供一穩定且均勻的溫度環境，這設計除了免除使用大型且固定式的細胞培養箱外，也方便使用者在恆溫的環境下進行細胞培養的相關觀察活動。



圖 9. ITO 溫控玻璃模組之外觀⁽¹⁰⁾。

六、未來與挑戰

在藥物的研究工作上，儘管微流體細胞培養系統將帶來許多技術優勢。然而，這項新興研究工具的使用，似乎尚未引起革命性的變革。目前相關領域的研究工作，大多數仍只是概念驗證展示，從概念驗證到實際應用之間，仍有許多技術障礙需要被克服。其主要的挑戰包括：(1) 微流體細胞培養系統的開發者 (工程師) 與使用者 (醫藥研究人員) 之溝通、(2) 生物驗證、及 (3) 高通量檢測。就第一項挑戰而言，成功地開發一項微流體細胞培養系統，有賴於工程師與醫藥研究人員之密切溝通，其裝置設計應避免醫藥研究人員在執行藥物測試時出現太多操作障礙，並且使醫藥研究人員能夠獲取有意義之研究數據。就生物驗證而言，當使用一項新穎的研究工具時，如何解釋其所獲得的研究數據常常充滿挑戰。不可避免地，這需要進行許多基礎研究來彌合新式與傳統研究方法間之差異，同時也要進行有效的臨床試驗來驗證其功效。而第三項挑戰則是關於如何利用微流體細胞培養系統來進行高通量研究工作，藥物研究工作常常涉及高通量篩選或測試，而這些工作常常是依賴技術成熟的高通量分析或檢測設備 (例如：高通量多孔盤讀取機) 來執行。然而，這些高通量設備與微流體細胞培養系統似乎不相容，因此開發可適用於微流體細胞培養系統之高通量檢測與分析方案將會是當務之急。

參考文獻

1. M. H. Wu, *Biomedical Microdevices*, **13**,131 (2011).
2. G. M. Walker, *Lab Chip*, **4**, 91 (2004).
3. K. Seaman, *Med-X*, **1**, 11 (2023)
4. M. H. Wu, *Surface and Interface Analysis*, **41**, 11 (2009).
5. M. H. Wu, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **176**, 86 (2013).
6. M. H. Wu, *Biomedical Microdevices*, **13**, 789 (2011)
7. J. Ko, *Nature Review Bioengineering*, (2024) <https://doi.org/10.1038/s44222-024-00163-8>
8. A. D. Castiaux, *Anal. Methods*, **11**, 4220 (2019)
9. B. D. Cardoso, *Adv. Healthcare Mater.* **12**, 2202936 (2023)
10. S. B. Huang, *Lab on a Chip*, **13**, 1133 (2013).

作者簡介

吳旻憲為英國牛津大學工程科學博士，現為長庚大學生物醫學工程系 特聘教授。

Min-Hsien Wu received his Ph.D. in the Department of Engineering Science at University of Oxford. He is currently a Distinguished Professor in the Department of Biomedical Engineering at the Chang Gung University.

器官晶片結合介電泳技術應用於 肝癌藥物篩選

Integration of Dielectrophoresis Technology with Organ-on-a-chip for Screening Liver Cancer Drug

趙梓茵、施采妤、王曉涵、孫偉倫、李岡遠、王克舜、劉承賢

Zih-yin Chao, Tsai-Yu Shih, Xiao-Han Wang, Wei-Lun Sun, Kang-Yun Lee, Ke-Shun Wang
Cheng-Hsien Liu

癌症治療一直是醫學研究的焦點，研究學者利用不同的方式精進癌症治療的方式，包括研究致病機制、診斷用的生物標誌、以及不同的治療方式，其中微流體技術是一門透過生物相容性材料與工程技術的結合，在體外精準模擬人體器官組織的環境，藉此方式可透過不同的晶片設計達到不同的研究方式。特別是肝癌，每年約八十萬的患者被診斷出罹患肝癌，且每年約七十萬人因肝癌過世，迫切需要更好的方式增進藥物治療的效果。透過微流道設計出不同的腫瘤微環境陣列式腔室，包括不同的氧氣濃度、酸鹼值濃度、以及利用工程方式增加抗藥性的環境，提高了測試的多樣性並縮短了實驗時間。晶片的微環境利用常用的免疫治療、化療、以及標靶藥物測試，驗證上述的變因與患者治療之相關性。微流道晶片的使用可提供更多元以及複雜的微環境，以期在短期內實現精確的個人化用藥。

The treatment of cancer has consistently been a primary focus of medical research. Microfluidic technology and highly biocompatible materials simulate the physiological conditions of human organs and tissues in vitro. This approach is utilized to create various biomedical chips that mimic the complex environment of tumor microenvironments. Through the utilization of minute quantities of samples and chemicals, precise experimental outcomes can be achieved. Furthermore, our design includes multiple array-type chambers that feature distinct tumor microenvironments. The chambers regulate diverse conditions, including oxygen and pH concentrations, and employ dielectrophoretic force to facilitate interactions between cancer cells and fibroblasts. The presence of multiple chambers enables the concurrent performance of diverse biological detections and drug selections on a singular chip, thereby improving experimental efficiency and minimizing the duration of experiments. It is anticipated that personalized chips will be employed in evaluating immunotherapy, chemotherapy interventions, or targeted drugs to assess the extent to which external factors influence the relationship between test outcomes and patient therapy. The objective is to enhance the accuracy of auxiliary treatment information provided by the chip, facilitate more precise personalized medicine for diverse patients in the future, and alleviate medication-induced discomfort. This novel organ chip offers an efficient and cost-effective platform for drug development in cancer treatment and pathological research. It also functions as a crucial point of reference for clinical interventions and facilitates the creation of a personalized chip tailored to the patient's sample.

一、器官晶片技術背景

隨著全球疾病的日益嚴重，癌症治療一直是醫學研究的焦點，特別是肝癌，每年約八十萬的患者被診斷出罹患肝癌，且每年約七十萬人因肝癌過世，迫切地需要更好的方式增進藥物治療的效果。現代研究已揭示了腫瘤周邊微環境對於癌症治療的關鍵作用。腫瘤微環境通常為癌細胞提供了有利的生長條件，其中包含了缺氧環境和腫瘤組織周遭弱酸環境，因此改變這種微環境對治療至關重要。為此，我們首先建立能夠調控氧氣濃度環境的陣列式晶片，進行化療藥物的組合選取。其次在晶片上添加酸鹼值變化的濃度條件，觀察免疫以及化療藥物組合治療的效果。再進一步利用電極結構創造肝癌腫瘤的環境，以介電泳力緊密排列癌細胞與纖維母細胞，再進行藥物的篩選。此仿生肝晶片平台的優勢在於：能有系統性及穩定地觀察，以取代傳統單一細胞，平面測試的過於單純化的系統。透過微量、精度、以及效率的優勢，有助於制定個人化的治療方案。

生物微機電系統 (BioMEMS) 是指細胞和分子等生物成分與微型化機電系統的整合。這個跨學科領域結合了生物學、微加工、電子學和機械學的原理，創造出可以與生物實體相互作用的設備和系統，製成相關晶片，用以執行醫療檢驗，環境檢測等一系列需求。生物晶片可以分為三大類，(1) 大量平行實驗的處理，即微陣列型生物晶片 (microarray)；(2) 微流體技術與生物技術的功能整合，稱為全微分析系統 (micro-total analysis system) 或實驗室晶片 (lab-on-a-chip)；(3) 在生醫晶片上建立仿生環境用以相關的生物醫學研究 (organ-on-a-chip)。此外，生醫晶片可以透過持續灌流、細胞共培養 (cell co-culture) 等結構來模擬人體內細胞生長的環境。生醫晶片同時也具有整合性，藉由串聯多種器官晶片，達到模擬全人體功能的效果。與傳統的體內實驗相比，微流體系統在樣品的量少、實驗時間短和操作成本低方面也具有卓越的優勢，可以更有效率地篩選出適合用於治療的腫瘤微環境，且相較動物實驗所引發的道德爭議以及與人體環境不符之疑慮，微流道晶片可能更適合於測試腫瘤微環境。

二、腫瘤微環境 (Tumor Microenvironment)

腫瘤微環境是指腫瘤細胞周圍的環境，包括細胞和細胞外基質之間的相互作用。它是一個複雜的生態系統，由腫瘤細胞自身和周圍正常細胞組成，例如纖維母細胞、免疫細胞、內皮細胞、周細胞還有神經元等組成。腫瘤微環境中，腫瘤細胞和正常細胞之間通過多種細胞因子、生長因子和細胞信號進行交流與相互作用。這種相互作用影響了腫瘤的生長、侵襲、轉移和治療反應。在腫瘤微環境中，正常細胞對腫瘤細胞的影響包括：

1. 纖維母細胞：促進腫瘤生長和侵襲，促進血管增生，提供腫瘤細胞所需的營養和氧氣供應。
2. 免疫細胞：會抑制免疫監控，幫助腫瘤細胞逃避免疫監視。這可能導致免疫耐受，使免疫系統難以識別和攻擊腫瘤細胞。
3. 內皮細胞和周細胞 (pericytes)：在血管的形成和穩定性方面起著重要作用，同時也參與腫瘤侵襲和轉移過程。腫瘤與免疫細胞之間的作用也同時受到血管內皮細胞的影響調控。周細胞則建構了轉移細胞的巢穴，促進癌細胞生長，以及透過旁分泌 (paracrine) 的作用產生抗藥性，包括透過極化腫瘤相關的巨噬細胞進行調控。
4. 神經元：與腫瘤相互作用，可能調節腫瘤的生長和轉移。

腫瘤微環境在癌症的發展和治療方面扮演著關鍵角色，了解腫瘤微環境的複雜性和相互作用，有助於開發更有效的癌症治療策略。

2.1 缺氧環境

缺氧是腫瘤的共同特徵之一，它主要是由於腫瘤中心區域的血液供應無法有效提供足夠的氧氣和營養物質所致。腫瘤細胞對缺氧的反應可能取決於暴露的持續時間，一些腫瘤細胞可能會適應缺氧的刺激並存活下來，其方法大部分是由 HIF-1 α 的基因表達路徑調控的，它促使腫瘤細胞表現更具侵略性的特徵⁽¹⁾，這可能導致腫瘤細胞的壞死或增加對治療的抵抗性，腫瘤中發現的氧氣含量嚴重降低導致大量促癌轉錄因數的啟動，這些轉錄因數促進腫瘤進展、血管生成、癌症幹細胞更新和轉移。由於 DNA 損傷的固定減少、細胞週期停滯、細胞增殖減少、基因和蛋白表達調節以及遺傳不穩定，缺氧能夠影響癌細胞的耐藥性。

而 HIF-1 α 的表達調控，也因缺氧非依賴性而可以通過氧化還原敏感機制上調表現量。其中的功能對於哺乳動物對全身的氧含量水平的細胞反應中具有重要作用。HIF-1 α 的蛋白活性受到許多轉譯後修飾的調節：羥基化、乙醯化和磷酸化調控⁽²⁾，主要功能包括：

1. 感知氧氣濃度：HIF-1 α 蛋白負責感知細胞周圍的氧氣濃度。在正常氧氣供應情況下，HIF-1 α 會受到一種特殊的蛋白質 (von Hippel-Lindau, VHL) 的降解，從而保持在低水平。然而，在低氧環境中 (缺氧或低氧條件)，HIF-1 α 蛋白不會被降解，而會積累在細胞核內。
2. 調控基因表達：HIF-1 α 蛋白在細胞核內積累後，與另一蛋白質 HIF-1 β 結合，形成 HIF-1 複合物。HIF-1 複合物可以結合到特定的 DNA 區域，這些區域通常位於一些氧敏感基因的啟動子區域上。這樣，HIF-1 複合物能夠刺激活化或抑制一系列基因的表達，從而調控細胞的生理和代謝過程，以適應低氧環境。
3. 促進血管生成：HIF-1 α 也可以促進新的血管生成，這在缺氧組織或腫瘤中尤為重要。這個情況下可以誘導一些生長因子的表達，其中包括血管內皮生長因子 (VEGF)，這有助於血管形成，以改善氧氣供應⁽³⁾。
4. 調控代謝：HIF-1 α 還影響細胞的代謝途徑。在低氧條件下，HIF-1 α 可以推動細胞將代謝途徑從氧氣依賴型切換到無氧代謝，以確保細胞在氧氣供應有限的情況下仍能生存⁽⁴⁾。在常氧條件下，由 VHL 引起的途徑會迅速降解 HIF-1 α ；然而，在缺氧下，HIF-1 α 蛋白降解被阻止，並且因為 HIF-1 β 的關係積累下來，進而對下游目標基因發揮轉錄作用。

2.2 弱酸環境

癌細胞是一種不正常增生的突變細胞，不受控制迅速增殖的腫瘤團塊限制了周邊血液以及氧氣供應，因此癌細胞經常處於缺氧與養分不足等多重壓力環境中，如圖 1 所示。癌細胞利用有氧糖酵解進行細胞代謝，從而導致葡萄糖攝取率增加，儘管有氧氣存在，但仍傾向於產生乳酸，所產生的過量乳酸與氫離子等酸性物質來不及回到血液系統而堆積於細胞外，致使腫瘤組織周遭微環境的酸鹼度從原本正常的弱鹼性 (pH 7.4 $\pm$ 0.05)，逐漸變成弱酸性 (pH 6.0~6.9) 之特殊現象⁽⁵⁾。此外這種弱酸環境也可能是引發更惡性的癌症表現型之重要因素。目前已發現許多跨腫瘤細胞的膜轉運蛋白用於平衡癌細胞中的 pH 值，進一步可以透過膜轉運蛋白來操縱癌細胞微環境 pH (pHe) 和細胞中 pH (pHi) 比率，誘導癌細胞凋亡，提高治療效率。

由於癌細胞的異質性使然，儘管目前有相當多種治療方式，癌症依然是難以痊癒的疾病，使相關的治療具有挑戰性。其中腫瘤周圍的微環境在癌症進展和治療抗藥性中起著至關重要的作用。因其包括血液供應、免疫細胞和支持組織等因素，可以為癌細胞提供保護性生

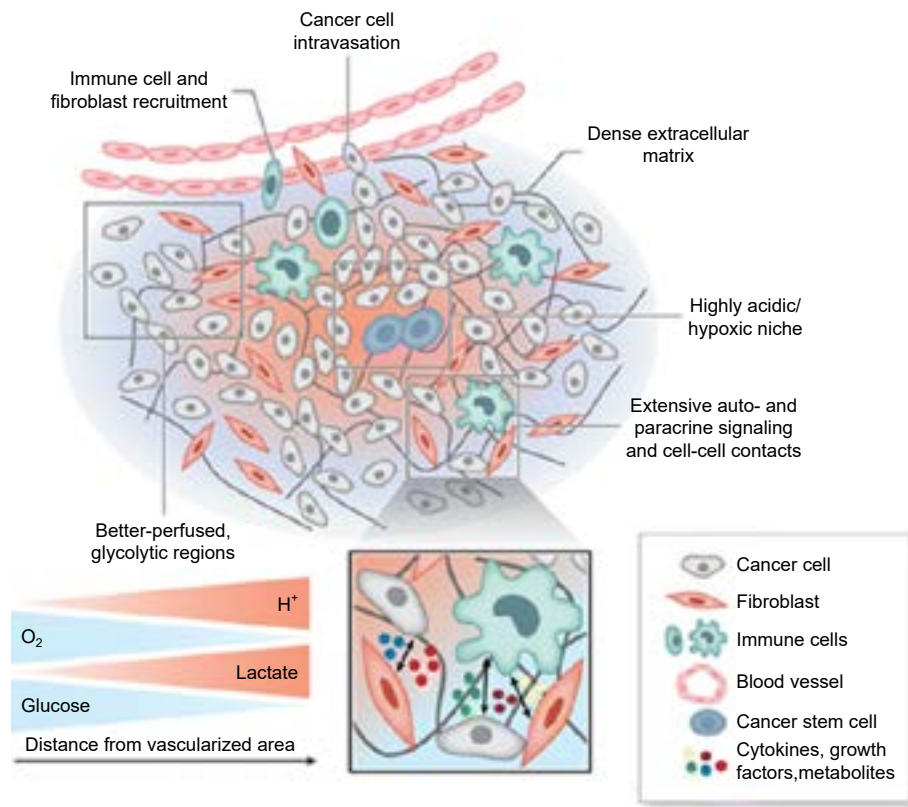


圖 1. 腫瘤微環境⁽⁶⁾。

態，使得藥物難以到達並有效靶向惡性細胞，讓治療癌症過程更加的困難。再加上許多癌症治療，例如化療和放射治療，都會損害正常的健康組織，導致病人的身體更加虛弱，在治療後容易復發，甚至對腫瘤產生抗藥性。因此如何提高癌症治療效率，是現今醫學上的一大挑戰。

三、粒子介電泳理論 (Dielectrophoresis, DEP)

1978 年，H. A. Pohl 表示一個介電粒子若處於不均勻電場中而產生運動，此現象為粒子介電泳⁽⁷⁾。造成粒子所需的力不需要粒子本身帶電，並且粒子在電場環境中皆存在介電泳現象，只是會根據粒子本身的電學性質與物理性質 (大小或形狀) 以及環境條件而影響此現象的發生程度。透過 DEP 公式：

$$F_{dep} = \frac{1}{2} \pi a^3 \epsilon_m \text{Re} f_{CM} \nabla E^2$$

可得知，介電泳力將由粒子半徑、溶液介電常數、極化因子和電場梯度平方決定。電場下的介電泳力 (F_{dep}) 的符號主要受極化因子 (f_{CM}) 的影響，該極化因子是 Clausius-Mossotti 因子，縮寫為 CM 因子：

$$f_{CM} = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m}$$

由於介電粒子在不均勻電場中會受到電場的誘導而被極化，於粒子平行電場的兩端產生大小相等但電性相反的電荷，而我們可以根據粒子能夠被極化的程度來將粒子介電泳分為正介電泳 (positive dielectrophoresis, pDEP) 與負介電泳 (negative dielectrophoresis, nDEP)，如圖 2。當粒子極化程度比環境介質還大時，粒子會往強電場方向移動，即正介電泳；反之，若粒子極化程度比環境介質還小時，粒子則往弱電場方向移動，即負介電泳。

1. 正介電泳效 (positive DEP, pDEP, $f_{CM} > 0$) :

粒子極化能力比溶液強，由於電荷異性相吸，在粒子表面的電荷會與溶液內的相異電荷相吸，使粒子誘發出較多電荷，造成粒子與溶液有一由上往下（負電荷至正電荷）之電偶極矩，此時電偶極方向和電場方向相同，因此粒子會被吸引至較強電場分佈區域，稱為正介電泳效應。

2. 負介電泳效應 (negative DEP, nDEP, $f_{CM} < 0$) :

粒子比溶液的極化能力弱，溶液誘發出的電荷影響較大，使粒子與溶液介面受到一由下向上 (正電荷至負電荷) 與電場方向相反之電偶極矩作用，於是粒子被排斥至較弱電場分佈的區域，此時稱為負介電泳效應。

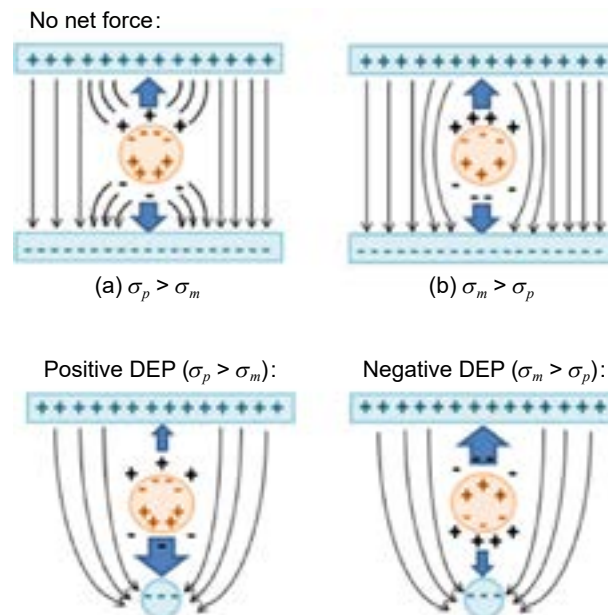


圖 2. 正負介電泳現象示意圖。

四、器官晶片用於肝癌治療

4.1 肝癌與癌症治療抗藥性

細胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 佔原發性肝癌組織學亞型的 80% 以上，排名全球第四大癌症相關死因^(8, 9)。HCC 的腫瘤發生有很多因素，包括慢性 B 型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染、慢性 C 型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 感染和飲酒⁽¹⁰⁻¹³⁾。所有這些致病因素都可能造成肝損傷、慢性疾病並促進肝硬化的發展，導致肝衰竭和肝癌發生⁽¹⁴⁾。如果患者在早期被診斷出來，建議採取手術切除、射頻燒灼術 (radiofrequency ablation,

RFA) 和肝臟移植等治療方法以達到完全治療的目的^(15, 16)。然而，對於診斷為無法手術的患者，例如處在局部晚期或有遠端轉移，巴塞隆納臨床肝癌分期 (Barcelona clinic liver cancer classification, BCLC) B 級的患者建議以肝動脈栓塞化學療法 (TACE) 治療，C 級的患者則是化療、標靶治療及免疫治療⁽¹⁷⁻¹⁹⁾。由於肝細胞癌分子作用機制目前仍然未知，為了瞭解腫瘤微環境是如何影響抗癌藥物抗藥性的產生及其分子機轉，我們需要在體外重新構建肝細胞癌腫瘤，並研究癌相關纖維細胞和腫瘤相關內皮細胞如何促進肝癌細胞產生抗藥性。

4.2 肝結構模型

對肝結構常見的描述有兩種，分別為肝小葉模型以及肝腺泡模型，肝小葉模型強調的是肝的外分泌性質，血液循環的方向為肝門靜脈一開始會從最靠近六角結構外側的肝細胞漸漸的滲透至靠近中央靜脈區的肝細胞，並於最後才會入中央靜脈。

近年來，由於病理學的知識日進漸增，因此提出了新穎的模型即為肝腺泡的概念，此種模型強調的是肝的代謝功能，會根據肝內的循環血流以及肝細胞的關係建立而成的，肝腺泡是由兩個相鄰的各六分之一的肝小葉所組成的，其面積約為三分之一個肝小葉的大小，被認為是具有肝臟功能的最小單位，也是肝臟最小的結構單位。因此需要在體外重新構建肝細胞癌腫瘤，如圖 3(c) 所示，並研究癌相關纖維細胞和腫瘤相關內皮細胞如何促進肝癌細胞產生抗藥性。

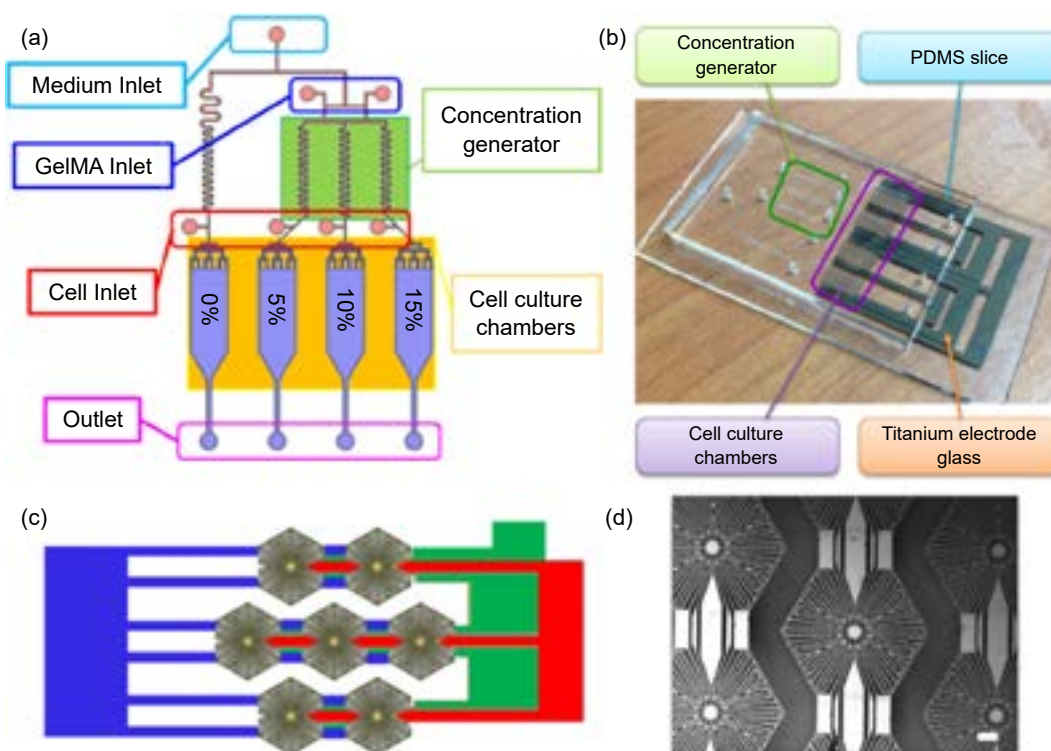


圖 3. 模擬肝小葉器官晶片的設計。(a) 示意圖顯示模擬肝小葉器官晶片配置：濃度產生器、細胞培養室、一個介質入口、兩個 GelMA 入口、四個細胞入口和四個出口。(b) 透過軟光刻製造微通道的 PDMS，然後使用氧電漿使其與印有鈦電極的基板玻璃黏合。(c) 三種不同的顏色代表三個獨立的鈦電極。電極架構是由六邊形圖案組成的陣列。實際設計中，一個細胞培養室有 13 組電極圖案。(d) 晶片上 DEP 鈦電極的顯微鏡影像。

4.3 模擬肝小葉器官晶片之設計

此肝小葉模擬器官晶片，由三個組成組件：(1) 濃度梯度產生器，(2) 介電泳細胞圖案，(3) 細胞培養室提供培養微環境 (圖 3)。使用 NIH-3T3 (小鼠胚胎成纖維細胞系) 和 HepG2 細胞 (C3A、人類肝癌細胞系)，並透過介電泳 (DEP) 進行圖案化以重建肝小葉的徑向輻射對稱的組織。圖案化的細胞上覆蓋著一層專門的稱為 GelMA 的水凝膠可用於共同培養兩種細胞。

當對電極施加電壓時，六角形電極會產生非均勻電場梯度。透過 DEP 力，肝癌細胞和癌症相關纖維母細胞 (或腫瘤相關內皮細胞) 被引導至六邊形電極的圓形區域，形成類似人體肝小葉的組織構造。

五、晶片應用

在成功建置模擬肝小葉的器官晶片後，我們可以利用其能夠共培養肝癌細胞與癌症相關纖維母細胞 (或腫瘤相關內皮細胞) 的能力，模擬人體內腫瘤微環境，並作為手術後的藥物選擇依據。因癌細胞與癌症相關纖維母細胞 (或腫瘤相關內皮細胞) 共培養時對藥物的反應

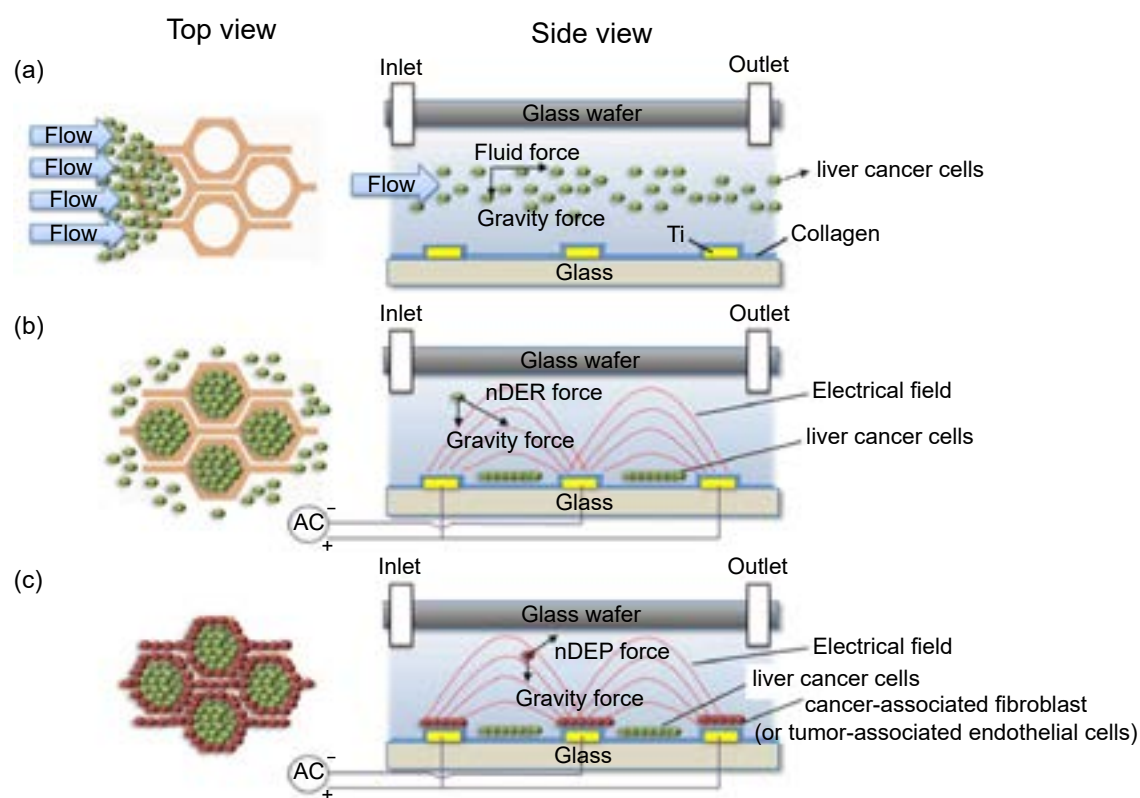


圖 4. 透過 DEP 力形成細胞圖案的示意圖。(a) 用 DEP 緩衝液處理的肝癌細胞被引入生物反應器室並隨機分佈。(b) 施加電壓使產生負 DEP 力施，肝癌細胞被引導至六邊形電極的圓形區域。(c) DEP 緩衝液被替換為細胞培養液，使肝癌細胞與基板充分黏附，的細胞培養基癌細胞。確保肝癌細胞黏附後，重複步驟 (a)、(b)、(c) 來操作 pDEP 使癌症相關纖維母細胞 (或腫瘤相關內皮細胞) 分佈於六角形電極的邊緣。

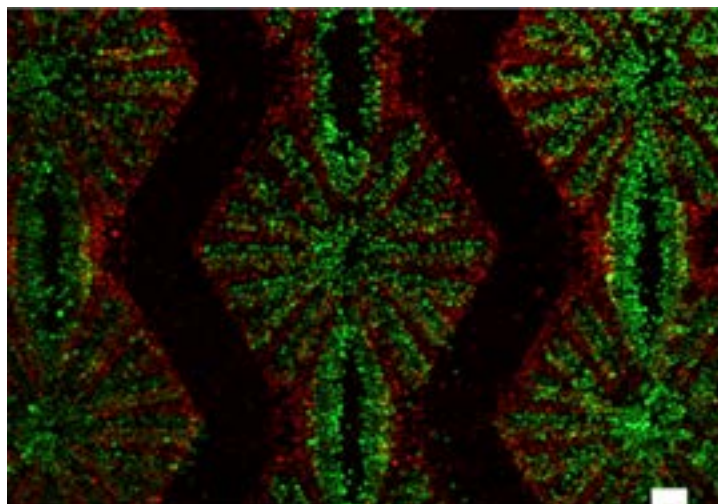


圖 5. 呈特殊圖案排列之肝癌細胞和癌症相關纖維母細胞，綠色螢光為肝癌細胞，紅色螢光纖維母細胞。

會與藥物直接施加在肝癌細胞上有所不同，可能產生比預期更高的抗藥性，在臨床診斷中，透過小型化提高實驗的精度和效率，減少樣品和試劑體積，同時提高分析速度，協助實現藥物治療的個體化，提供即時、準確的藥物反應數據，有助於制定個人化的治療方案。

參考文獻

1. G. L. Semenza, *Biochem. Pharmacol.*, **59** (1), 47 (2000).
2. "HIF1A," *Wikipedia*. Mar. 27, (2024), please refer to the website: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=HIF1A&oldid=1215901101>
3. G. L. Semenza, *Nat. Rev. Cancer.*, **3** (10), 721 (2003).
4. G. S. Falchook *et al.*, *Oncotarget*, **5** (21), 10280 (2014).
5. “為何癌細胞不怕酸中毒！？國衛院發現癌細胞適應酸性微環境壓力機轉”，國家衛生研究院. (2024). Please refer to the website:: <https://www.mohw.gov.tw/cp-5275-72857-1.html>
6. E. Boedtker and S. F. Pedersen, *Annu. Rev. Physiol.*, **82**, 103 (2020).
7. H. A. Pohl, *Dielectrophoresis: The Behavior of Neutral Matter in Nonuniform Electric Fields*. Cambridge; New York, (1978).
8. Global Burden of Disease Cancer Collaboration *et al.*, *JAMA Oncol.*, **3** (4), 524 (2017).
9. J. D. Yang, P. Hainaut, G. J. Gores, A. Amadou, A. Plymoth, and L. R. Roberts, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **16** (10), 589 (2019).
10. L. Kulik and H. B. El-Serag, *Gastroenterology*, **156** (2), 477 (2019).
11. J. F. Perz, G. L. Armstrong, L. A. Farrington, Y. J. F. Hutin, and B. P. Bell, *J. Hepatol.*, **45** (4), 529 (2006).
12. J.-W. Park *et al.*, *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver.*, **35** (9), 2155 (2015).
13. P.-H. Huang *et al.*, *J. Cancer.*, **10** (23), 5735 (2019).
14. S. K. Asrani, H. Devarbhavi, J. Eaton, and P. S. Kamath, *J. Hepatol.*, **70** (1), 151 (2019).
15. J. A. Marrero *et al.*, *Hepatol. Baltim. Md.*, **68** (2), 723 (2018).
16. M. Omata *et al.*, *Hepatol. Int.*, **11** (4), 317 (2017).
17. K.-H. Liang *et al.*, *Pharmacogenomics*, **17** (4), 353 (2016).
18. C.-L. Lin *et al.*, *Scand. J. Gastroenterol.*, **49** (12), 1456 (2014).
19. C.-T. Yeh *et al.*, *BMC Cancer.*, **11**, 117 (2011).

作者簡介

趙梓茵小姐現為國立清華大學奈米工程與微系統研究所碩士生。

Zih-Yin Chao is currently a M.S. student in the Institute of NanoEngineering and MicroSystems at National Tsing Hua University.

施采妤小姐現為國立清華大學奈米工程與微系統研究所碩士生。

Tsai-Yu Shih is currently a M.S. student in the Institute of NanoEngineering and MicroSystems at National Tsing Hua University.

王曉涵小姐現為國立清華大學動力機械工程學系碩士生。

Xiao-Han Wang is currently a M.S. student in the Department of Power Mechanical Engineering at National Tsing Hua University.

孫偉倫小姐為荷蘭拉德堡德大學醫學中心生醫博士，現為論泰生技執行長。

Wei-Lun Sun received her Ph.D. in Biomedicine Sciences, Radboud University Medical Centre, Nijmegen. She is currently a Chief Executive Officer in Pythia Biotech Ltd.

李岡遠醫師為英國倫敦大學帝國學院國立心肺研究所博士，現為臺北醫學大學副校長、臺北醫學大學醫學院 / 醫學系 / 內科學科教授，論泰生技共同創辦人。

Kang Yun Lee received his Ph.D. from Imperial College London. He is currently an Executive Vice President of Taipei Medical University and a Professor at Internal Medicine, School of Medicine, and College of Medicine, Taipei Medical University. He is also a Co-founder of Pythia Biotech Ltd.

王克舜先生為美國密西根安得魯斯大學企業管理碩士，現為論泰生技董事長。

Ko-Shun Wang received his M.S. in the School of Business Administration from Andrews University. He is currently a Chairman of the board in Pythia Biotech Ltd.

劉承賢先生為美國史丹佛大學機械工程博士，現為國立清華大學動力機械工程學系 / 奈米工程與微系統研究所 / 半導體學院 / 精準醫療博士學位學程 / 智慧生醫博士班學程教授，論泰生技共同創辦人。

Cheng Hsien Liu received his Ph.D. in Mechanical Engineering from Stanford University. He is currently a Professor in the Department of Power Mechanical Engineering / Institute of NanoEngineering and MicroSystems / College of Semiconductor Research / Precision Medicine Ph.D. Program / Ph.D. Program in Biomedical Artificial Intelligence at National Tsing Hua University. He is also a Co-founder of Pythia Biotech Ltd.

整合壓電薄膜感測器之心臟器官晶片及其在藥物篩檢之應用

A Cardiac-chip Integrated with a Piezoelectric Thin-film Sensor and its Application of Drug Screening

陳冠維、黃筠涵、楊秋鳳、許聿翔

Kuan-Wei Chen, Yun-Han Huang, Chiou-Fong Yang, Yu-Hsiang Hsu

心臟晶片是在器官晶片及微生理系統領域中較為複雜且特殊的系統，其主因為心肌細胞的刺激－收縮耦合之工作機制，因此需要能針對心肌組織的施力收縮特性進行監測，才能探知心血管藥物的功能，以及非心臟藥物的毒性。而目前心肌對藥物反應的定量方式是以高解析度光學設備監測心肌節收縮程度為主，但也因此無法有效提升檢測通量。另外，動物模型亦是臨床前試驗的常用的心臟模型，但由於與人類基因上仍有差異，易造成在進入人體實驗時才發現功能落差或心臟毒性的問題，因此目前藥廠缺乏一種可靠且可自動監測的臨床前體外心臟模型。本研究開發一種創新心臟壓電耦合系統，其核心技術為在壓電薄膜上培養人類誘導性多功能幹細胞所轉化之心肌組織的技術，並以電刺激及微溝槽的微生理環境使其成為高成熟度及同步之心肌組織，即可藉由壓電效應將心肌組織施力收縮的頻率與力量以電子訊號輸出。此心臟壓電耦合系統的優勢為可直接以壓電訊號監測心肌組織在不同藥物作用下的施力行為，並可將收縮頻率及力量進行定量分析，並具有獲得半效應濃度及半抑制濃度之藥物功能的判定及定量的檢測能力。

The cardiac chip represents a sophisticated and distinctive system within the realm of organ-on-a-chip (OoC) and microphysiological systems (MPS). The phenomenon can be attributed primarily to the excitation-contraction coupling mechanism of cardiomyocytes. Hence, it is crucial to observe the force contraction characteristics of cardiac tissue to investigate the effectiveness of cardiovascular medications and the cardiotoxicity of non-cardiac drugs. Currently, the prevailing approach for assessing the myocardial reaction to drugs involves utilizing a high-resolution optical system for visualizing sarcomere contractions; however, this method is constrained by its limited throughput capacity. Conversely, the genetic variations between animals and humans prevent the extrapolation of low efficacy and severe cardiotoxicity until human studies are conducted. Hence, pharmaceutical companies continue to face a challenge in finding a dependable *in vitro* cardiac model equipped with automatic detection capabilities. In this investigation, an innovative hybrid system integrating cardiac and piezoelectric components is developed. The fundamental technology

involves the cultivation of cardiac tissue using human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs) on a piezoelectric thin film. Electrophysiological stimulations and microgrooves are employed to establish a microphysiological environment that enhances the maturation and synchronization of cardiomyocytes. Subsequently, the cardiac contraction profile can be directly deduced from piezoelectric signals. The cardiac-and-piezoelectric hybrid system offers the advantage of utilizing piezoelectric signals to directly monitor the contraction behavior of cardiac tissue under various drug dosages. Additionally, it enables quantitative analysis of contraction frequency and force. Consequently, it is capable of determining the median effective concentration (EC_{50}) or median inhibitory concentration (IC_{50}) of drugs.

一、研究背景與動機

目前藥物開發 (drug development) 所需的時間需十至十五年的時程，且藥物的平均開發成本高達二十六億美元，其中有超過 90% 的藥物在開發過程中因藥物功能低下或具細胞毒性而必須終止，因此藥物開發是一項耗時且高成本的研究工作⁽¹⁾。其中心臟藥物開發及藥物心臟毒性的研究是最具挑戰的開發工作之一，其主因是心臟組織的功能是一種機械結構，透過刺激－收縮耦合 (excitation-contraction coupling, ECC) 的施力機制將血液打入血液循環系統之中，因此需實際監測心肌細胞的收縮行為才能進行藥物功能或心臟毒性的監測。然而目前在臨床前試驗的心臟模型以動物模型為主，但仍常因動物的基因與人類的差異，在進入臨床試驗後才發現藥物功能低下或具有心臟毒性，而因此必須中止開發。另一方面，近年來從人類誘導性多能幹細胞 (hiPSC-CMs) 及人類胚胎幹細胞 (hESC-CMs) 分化出心肌細胞的技術已相當成熟，但分化後的心肌細胞在一般細胞培養皿上仍需經過近 180 天的培養才能發展出具高度肌原纖維表現的心肌組織⁽²⁾，仍需相當可觀的成本。

因此，目前已許多研究團隊著手研發心臟晶片，希望利用體外心臟模型縮短開發的時間及成本。主要技術類型可分為以下三種：分別為光學式、壓阻式和本篇論文所提出的壓電式心臟晶片。在光學式的心臟晶片是將心肌細胞培養在矽橡膠懸臂樑上，利用影像抓取心肌細胞收縮時所造成的懸臂樑彎曲形變⁽³⁾，間接取得心肌的跳動頻率。此技術降低對光學解析度的要求，但仍因光學設備上的限制，每次能監測的懸臂樑數量仍有限。在壓阻式的心臟晶片則是在矽橡膠內植入壓阻式感應器，透過心肌細胞在矽橡膠懸臂量或薄膜上收縮所產生的機械形變改變電阻值⁽⁴⁻⁵⁾，再經電路轉成電壓訊號，因此具有發展成較大陣列的優勢。在這些技術中懸臂樑是主要用來介面心肌施力的機械結構，但由於心肌細胞所組成的組織不易發展成與懸臂樑主軸同向的施力收縮方向，因此除了產生彎曲外，亦容易產生扭轉，因此造成電訊號複雜性及在不同懸臂樑間定量心肌對藥物反應的困難度。另一方面，光學式及壓阻式心臟晶片皆以量測形變為主，因此無法直接量測心臟的施力強度。

除了檢測方法之外，人類誘導性多能幹細胞 (hiPSC) 及人類胚胎幹細胞 (hESC) 所分化的心肌細胞的技術已經相當成熟，並與成人心肌組織的表現相近，但因低成熟度的心肌組織的收縮特性不佳，而低同步性心肌組織的訊號雜亂且不易判定，因此其心肌組織須培養至具高度成熟且同步的組織才能進行量測。因此，心肌細胞的排列和成熟對於成功培養出具功能性的心臟組織是為開發出臨床前心臟藥物開發平台的一項重要課題，因此有許多心臟組織為生理環境的操控技術相繼發展出來，可分為被動式及主動式兩種。

被動式微生理環境包含微溝槽引導⁽⁴⁻⁶⁾、絲線結構⁽⁷⁻⁸⁾，及細胞外間質接觸式⁽⁹⁻¹¹⁾等三種方法，此三種方法的概念皆相似，即誘導心肌細胞在貼附時產生長條狀的結構，用以促進其提早成熟及同步。另外，亦有使用共培養的方式促進心肌組織成熟，研究顯示人類胚胎幹細胞源心肌細胞與內皮細胞共培養時，可以促使心肌細胞內部分 RNA 數量增加，可促進心肌細胞的成熟⁽¹²⁾。

而主動式微生理環境是在體外模擬心肌組織的刺激收縮耦合機制，其一為將心肌組織培養在柔性矽橡膠基材表面，再對此基材施加機械拉伸，心肌細胞在此生理環境下的排列將會傾向於與拉伸方向的垂直方向排列，並有極高的間隙連接 (gap junction) 表現⁽¹¹⁻¹³⁾。而第二種主動方式為施加週期性電刺激，以模擬心肌之電生理環境，心肌細胞在受到電刺激後可產生更強的收縮能力、更高的基因和蛋白表達，以及增強的鈣處理能力⁽¹⁴⁻¹⁶⁾。也有研究表明，使用更長時間的電刺激時間可使收縮的力度和頻率得到提高。在使用長達八天的電刺激，所發展出的心肌組織可以達到高水平的同步性和組織性⁽¹⁷⁾。

以下介紹本團隊所開發的心臟壓電耦合系統，此系統使用壓電薄膜作為監測心肌行為的感測裝置，並使用同心圓微溝槽結構及電刺激的微生理環境促進 hiPSC 心肌細胞成熟及同步。本研究結果驗證此系統可在培養七天後，經由壓電薄膜監測到具高度同步的心肌收縮特性曲線，並可用以做為量測心臟藥物的半效應濃度 (median effective concentration EC_{50}) 及半抑制濃度 (median inhibitory concentration IC_{50})。此系統的優勢是壓電薄膜的訊號是由心肌組織施力收縮時所造成的壓電薄膜形變，在電極上所產生的感應電荷，此感應電荷可藉由介面電路量測到，不須如壓阻式心臟晶片需續提供一電壓才能量測電阻變化，因此不會有在心臟晶片中產生漏電的疑慮，在晶片電路系統的複雜度亦降低許多，並具有發展成大型陣列系統的優勢，此研究成果已發表在 Lab-on-a-Chip 國際期刊⁽¹⁸⁾。

二、心臟壓電耦合系統

本篇研究所開發的心臟壓電耦合系統的系統架構圖如圖 1(a) 所示，此心臟晶片的核心為其基材是一個 10 微米厚的聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 壓電薄膜，在壓電薄膜的中心的位位置上下各鍍有 100 奈米厚的圓形鈦金屬電極，在培養心肌細胞的這面亦鍍有一層二氧化矽以利在其表面用壓印的方式轉印一層只有 5 微米厚的聚二甲基矽氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 同心圓微溝槽結構，在此微溝槽外圍並再黏上一層直徑 9 毫米，厚度 5 毫米的聚甲基丙烯酸甲酯 (poly (methyl methacrylate), PMMA) 的培養微槽陣列，在壓電薄膜的下方亦黏上另一層直徑 9 毫米，厚度 1 毫米的聚甲基丙烯酸甲酯的培養微槽陣列結構，此設計定義的每一個微槽的邊界條件為固定端。此同心圓結構的微溝槽結構提供一種微生理環境，可引導心肌細胞排列成同心圓結構，如圖 1(b) 所示之收縮的方向是以同心圓的方式收縮，圖 1(c) 為微溝槽結構之雷射掃描共軛焦顯微影像。在結合此圓形的固定端邊界條件的設計，此心臟晶片可控制心肌組織的施力收縮所造成的薄膜形變為極座標的 Sinc 函數形變，因此可以做為定量心肌施力強度的檢測依據。

此系統使用電流放大器將心肌組織的收縮施力所產生的壓電感應電荷轉成電壓訊號，並經過 10 Hz 的低通濾波器將高頻雜訊濾除，此設計可在不使用顯微鏡監測下，即可探知心肌組織的成熟及同步程度。心肌組織在經由同心圓微溝槽結構所提供的微生理環境刺激，在三至六天即可發展成具自我收縮能力的心肌組織。再使用壓電薄膜監測到心肌組織的收縮之

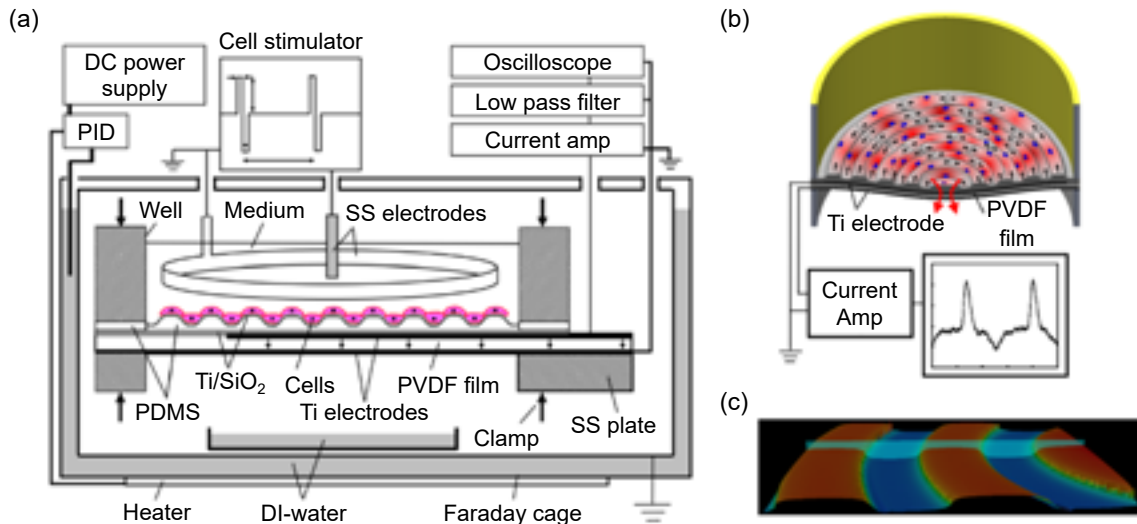


圖 1. 心臟壓電耦合系統的整體示意圖 (a)、同心圓心肌組織的排列以及施力收縮輸出訊號示意圖 (b)、及微溝槽結構的雷射掃描共軛焦顯微影像圖 (c)⁽¹⁸⁾。

後，即提供連續 8 小時的 1 Hz 電刺激之微生理環境刺激，以加速心肌組織的成熟及同步程度。此電刺激的裝置是通過在培養腔室內中央所設置的一直條型 304 不鏽鋼薄片電極，及在培養腔室的外圍有一個環狀 304 不鏽鋼電極的接地電極。

藉由上述的同心圓微溝槽結構及電刺激兩種微生理環境刺激後，此心臟壓電耦合系統可在 7 天左右培養出具有高成熟度及同步之心臟組織，圖 2(a) 及 2(b) 為所開發的心臟壓電耦合系統的兩種裝置，分別為四腔室及雙腔室兩種，可同時培養 4 個及 2 個心肌組織。在進行藥物功能及毒性量測時，此兩種心臟壓電耦合裝置置於一個雙層不銹鋼之水閘培養裝置中，此不鏽鋼裝置具有接地線，提供法拉第牢籠 (Farady cage) 電子雜訊屏蔽功能，並具有加熱板及定溫裝置，加熱水閘中的水，以維持 37 度的體溫及濕度，可進行長時間的藥物功能及毒性的監測工作。

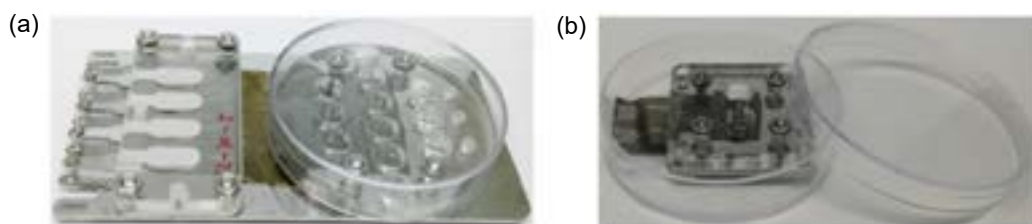


圖 2. 心臟壓電耦合系統的四腔室 (a) 及雙腔室裝置 (b)⁽¹⁸⁾。

三、心臟壓電耦合系統感測理論

本研究團隊應用 Hsu and Tang⁽¹⁵⁾ 所開發的以壓電薄膜結構感測細胞爬行的理論，推導出以圓形壓電薄膜結構感測同心圓心臟組織施力收縮的感應方程式。式 (1) 為將心肌組織培養在一壓電薄膜上的統馭方程式，因是圓形的結構，是以極座標方式表示⁽¹⁸⁾：

$$\nabla^2 \nabla^2 w(r, t) + \frac{\rho h}{D} \frac{\partial^2}{\partial t^2} w(r, t) = \frac{1}{D} \nabla^2 [l_c F_c(r) T_c(t)] \quad (1)$$

其中 $w(r, t)$ 為彎曲形變、 r 為半徑、 t 為時間、 ρ 為整體等效密度、 h 為整體等效厚度、 D 為彎曲剛性、 $F_c(r)T_c(t)$ 為心肌組織在收縮時於壓電薄膜上所施加的力， l_c 為心肌組織施力的具中性面的力矩。壓電薄膜的位移解可以表示成：

$$w(r, t) = \sum_{i=1}^{\infty} W_i(r) T_i(t) \quad (2)$$

此式假設同心圓結構的心肌組織已達到高度同步的施力收縮特性，因此所產生的壓電薄膜形變將與 θ 無關，而是與半徑相關的形變函數。

將式 (2) 式帶入式 (1)，並對半徑為 a 的壓電薄膜進行全域積分，並帶入固定端之邊界條件，可得到彎曲形變的通解。由於心臟跳動頻率為幾赫茲的頻率，因此心肌組織所產生的形變將由圓形壓電薄膜結構的第一自然響應頻率所決定，且所量測的頻率遠低於此第一自然響應頻率，因此可以將位移解簡化如下式⁽¹⁸⁾：

$$w(r, t) = \sin c(kr) \left\{ \frac{-2\pi T_c(t)}{D(\omega_1^2 - \omega^2)} \int_0^a [l_c F_c(r) \nabla^2 \sin c(kr)] dr \right\} \quad (3)$$

壓電薄膜的本構方程式為

$$D_3 = e_{31} S_1 + e_{32} S_2 + e_{33}^s E_3 \quad (4)$$

其中 D_3 是電場位移、 S_1 及 S_2 分別為在 x 及 y 軸方向的應變、 e_{31} 及 e_{32} 為相對定方向的壓電應變常數、 E_3 為 z 軸方向的電場、 e_{33}^s 為介電常數，此方程式說明在此面上的 x 、 y 軸方向應變和 z 方向的外加電場會在 3 方向表面產生感應電荷。

將式 (4) 轉為極座標，並將式 (3) 帶入，並對表面電極進行電場位移面積分，則可獲得壓電薄膜因心肌收縮所產生形變的壓電感應電荷，其可表示為⁽¹⁸⁾：

$$q(t) = C \cdot \left\{ \int_0^a [l_c F_c(r) \nabla^2 \text{sinc}(kr)] dr \right\} T_c(t) \quad (5)$$

其中

$$C = \left[\frac{2\pi^2 h_p (e_{31} e_{32})}{D(\omega_1^2 - \omega^2)} \int_0^{0.7a} \nabla^2 \text{sinc}(kr) dr \right] \quad (6)$$

由式 (5) 可知心臟壓電耦合系統所量測到的心肌收縮訊號與心肌在壓電薄膜上的施力大小成正相關，且第一模態 $\text{sinc}(kr)$ 為其空間權重函數，從式 (6) 可知，心臟壓電耦合系統可以監測到心肌組織的收縮特性曲線，可用以定量心肌的收縮頻率及強度。

四、實驗方法與步驟

心臟壓電耦合裝置在實驗前使用 UVC 紫外光進行滅菌，再於微溝槽表面附著 $5\ \mu\text{g/ml}$ 纖維連蛋白 (fibronectin, FN) 或 0.1% 明膠 (gelatin, GL)，及內皮細胞 (huvec, HU)，以作為促進心肌細胞附著之表面處理，在此研究中比較三種基質表面，分別為 FN、FN/HU、GL/HU。在完成表面處理後，種入 hiPSC 心肌細胞，在培養三天後即開始使用介面系統監測心肌組織的發展，藉由心肌組織的收縮施力的特性曲線，判斷心肌組織的發展是否足夠成熟及達到高度同步的組織。再量測到具有穩定的心肌自我收縮的訊號後即施加 8 小時的電刺激，以加速心肌細胞跳動同步的發展。待心肌組織達到高成熟度及同步性後，即使用市售之心臟藥物 Isoproterenol (異丙腎上腺素) 及 Metoprolol (美托洛爾) 進行心臟壓電耦合系統的藥物篩檢功能性驗證。Isoproterenol 可提高心律和心肌細胞的代謝能力，Metoprolol 則能降低心律。每一種藥以累進加藥的方式提高藥物濃度，並在每次增加藥劑量後量取三次的電訊號，並重複三次實驗，再進行 Isoproterenol 的 EC_{50} 和 Metoprolol 的 IC_{50} 值的定量。

量測到的心肌組織的收縮頻率及施力強度可用以下之式 (7) 及式 (8) 進行定量分析，是為平均頻率 (F) 及平均振幅 (A)：

$$F = \frac{\sum_{m=1}^n (f_m \cdot a_m)}{\sum_{m=1}^n a_m} \quad (7)$$

$$A = \frac{\sum_{m=1}^n (f_m \cdot a_m)}{\sum_{m=1}^n f_m} \quad (8)$$

其中 f_m 和 a_m 和為第 m 筆資料點。在記錄在各濃度藥劑量下的平均振幅與頻率後，即可進行半效應濃度 (EC_{50}) 及半抑制濃度 (IC_{50}) 之藥物功能的計算。

在完成實驗後，心肌組織即進行固定及將心肌細胞的細胞核、觀察肌節 (sarcomere) 結構的甲型肌動蛋白原 α -actinin 以及進行肌動蛋白纖維 (actin-filament) 染色，分別為藍色、綠色、及紅色螢光。而心肌細胞的成熟度則以細胞核的橢圓度進行分析。橢圓度的公式為式 (9)， a 及 b 分別為細胞核的長軸跟短軸，越接近 1 代表越為橢圓，0 代表為圓形，且代表心肌細胞更為成熟。

$$\text{Ellipticity} = \frac{a-b}{a} \quad (9)$$

五、實驗結果

圖 3(A)-3(C) 為使用心臟壓電耦合裝置所培養出的心肌組織，分別是培養在 FN、FN/HU 和 GL/HU 三種不同基質的微溝槽上，由實驗結果可知，在三種基質上皆可在七天內發展出具有同心圓結構的心肌組織。在每個培養參數下，皆有極佳的肌節結構的表現，如圖 4(A)-4(C) 所示。

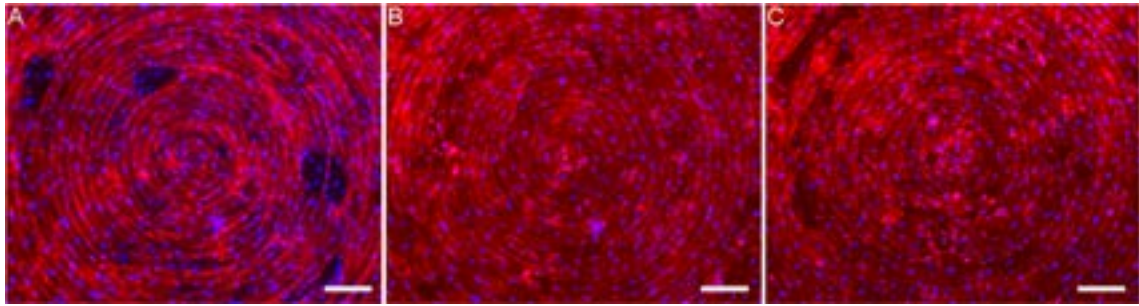


圖 3. 於心臟壓電耦合裝置中所培養出之同心圓心臟組織：FN (A)、FN/HU (B)、GL/HU (C)，比例尺為 $200\ \mu\text{m}^{(18)}$ 。

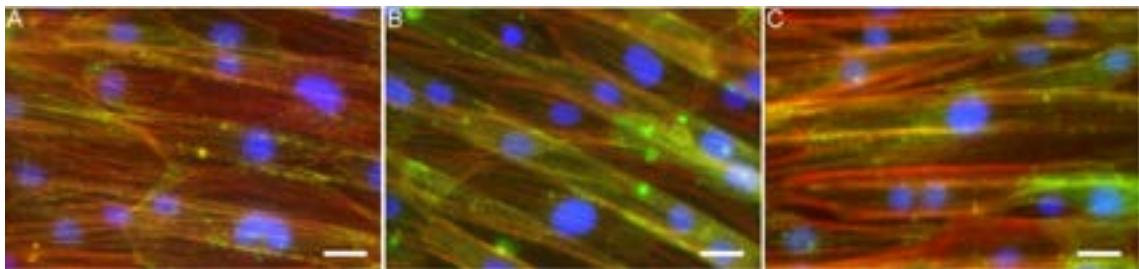


圖 4. 於心臟壓電耦合裝置中所培養出之同心圓心臟組織的肌節結構：FN (a)、FN/HU (b)、GL/HU (c) 比例尺為 $20\ \mu\text{m}^{(18)}$ 。

為了探討所培養出的同心圓心肌組織的成熟度，本團隊將不同半徑範圍的心肌組織的肌節長度及細胞核橢圓度進行定量，分析結果如圖 5(a) 及 5(b) 所示。由圖 5(c) 的橢圓度分析所示，在三種培養環境上的細胞核都具有橢圓的結構，代表心肌細胞皆有高度肌原纖維表現，且從中心至外圍在細胞核的橢圓度表現上並沒有顯著的差異，在三種培養基質上的細胞核的平均橢圓度分別為 0.242 ± 0.046 、 0.308 ± 0.065 及 0.26 ± 0.050 。此結果顯示在心臟壓電耦合裝置內培養出的心臟組織皆有相當的成熟度。

圖 5(b) 比較心肌組織在不同半徑下的肌節長度表現，在 FN、FN/HU、及 GL/HU 基質上培養的心肌細胞的肌節在半徑為 $0.26\ \text{mm}$ 至 $2.36\ \text{mm}$ 的平均肌節長度分別為 $1.79\ \mu\text{m} \pm 0.15\ \mu\text{m}$ 、 $1.86\ \mu\text{m} \pm 0.08\ \mu\text{m}$ 、及 $1.74\ \mu\text{m} \pm 0.07\ \mu\text{m}$ 。而在同心圓中心半徑為 $0.07\ \text{mm}$ 內的心肌肌節長度，在 FN 基質表面培養的結果顯著小於在 FN/HU 及 GL/HU 的結果，此實驗結果顯示微溝槽在半徑小於 $0.07\ \text{mm}$ 的位置，其以表面形貌來誘導心肌細胞排列的微生理環境刺激效應下降，其原因可能為微溝槽的圓弧特徵長度已小於心肌細胞尺寸或相當，因此心肌細胞隨微溝槽進行同心圓的排列的機制降低，而改以橫跨在多個微溝槽結構，因此其成熟度下降。另一方面，此數據亦顯示出在此中心區域若先貼附一層 HUVEC 內皮細胞，將可促進心肌細胞的成熟度，如在 FN/HU 及 GL/HU 的肌節長度定量的結果，此實驗成果顯示心肌細胞與內皮細胞共培養將會提升心肌細胞的成熟度，與 Lee 等人的研究結果相同⁽¹⁹⁾。

圖 6(a) 及 6(b) 分別為使用市售心臟藥物 Isoproterenol 及 Metoprolol 的藥物功能性監測實驗結果，從實驗結果可知心臟壓電耦合系統可以量測出心肌組織在不同藥物施加濃度下收縮施力的特徵波型。圖 6(a) 顯示在 GL/HU 基質培養出的心肌組織在將 Isoproterenol 心臟藥物的濃度從 $0\ \text{nM}$ 逐漸量增加藥劑量到 $1\text{E}4\ \text{nM}$ ，心跳收縮的頻率及振幅亦逐漸上升，與

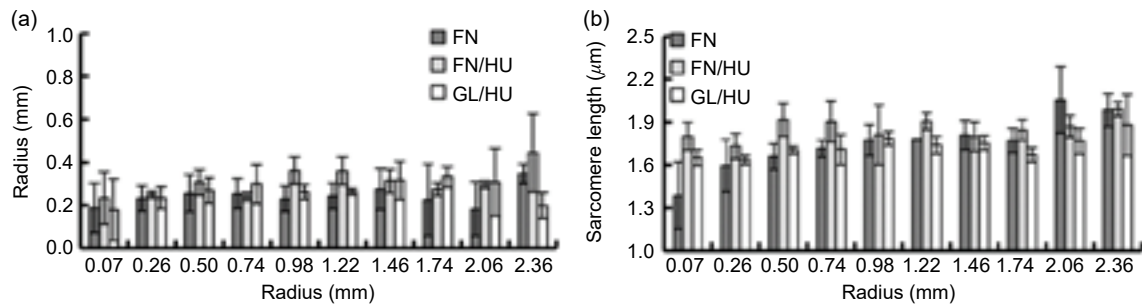


圖 5. 於心臟壓電耦合裝置中所培養出之同心圓心臟組織的細胞核橢圓度 (a) 及肌節長度 (b) 定量分析結果⁽¹⁸⁾。

Isoproterenol 的已知藥物機制相同。同樣的，圖 6(b) 所顯示的在 FN 基質上培養出的心肌細胞，在將 Metoprolol 心臟藥物的濃度從 0 nM 逐漸量增加藥劑量到 1E4 μ M，心跳收縮的頻率及振幅皆逐漸下降，並在 3E2 μ M 濃度時開始出現不規則的波形，如同 Metoprolol 用來抑制心肌細胞跳動的藥效表現是一致的。

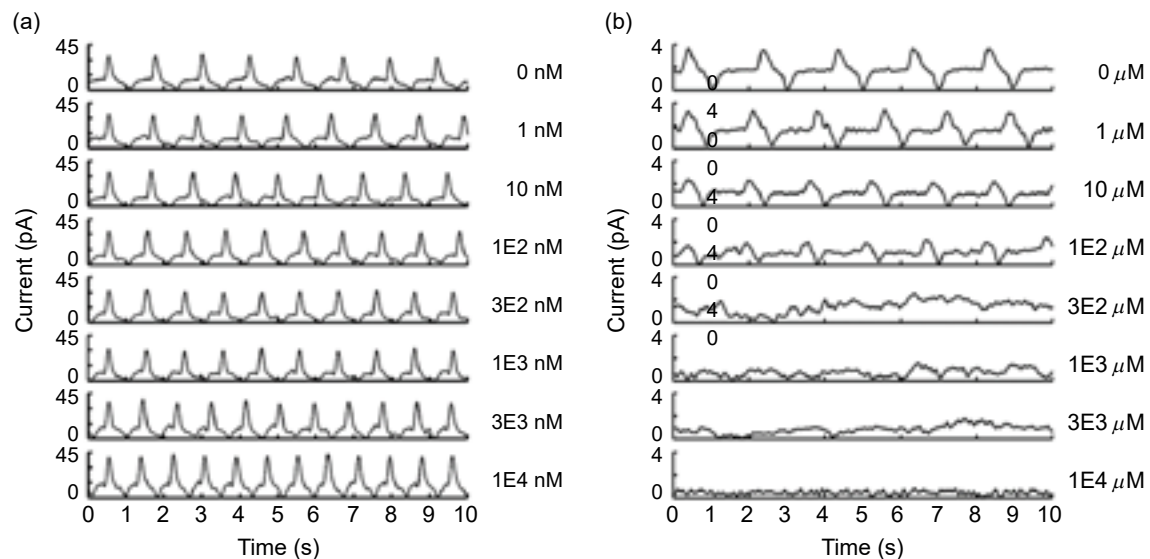


圖 6. 心肌細胞在施加不同藥劑量的 Isoproterenol 訊號波形 (a) 及 Metoprolol 訊號波形 (b)⁽¹⁸⁾。

上述的心肌收縮的特性曲線可經由快速傅立葉轉換 (Fourier transform, FT) 轉入頻率域，圖 7(a) 為加入 Isoproterenol 的心肌收縮訊號的頻譜響應，此分析結果顯示心肌組織的收縮基頻率隨 Isoproterenol 濃度增加而提高，從加藥前的 0.8 Hz (黑實線) 提升到 1E5 nM 的 1.2 Hz (綠色虛線)，且第二及第三高頻諧波亦隨之增高，且振幅亦隨之增加，此分析結果清楚顯示此心臟壓電耦合系統可以成功判定 Isoproterenol 對心肌組織的收縮頻率及力量的提升之功效。圖 7(b) 為 Metoprolol 心臟藥物的頻譜分析結果，在未投藥前的基頻為 0.5 Hz (黑實線)，在藥劑量為 3E2 μ M (灰實線) 時即降低至 0.4 Hz，且其峰值也大幅度的減少，且在更高濃度的 Metoprolol 藥物濃度下，其主要基頻及高頻諧波的振幅皆變得很小，顯示心臟壓電耦合系統確實可量測出 Metoprolol 的藥物功能。

總結投藥的實驗結果，此實驗驗證心臟壓電耦合平台可以有效的利用壓電薄膜來進行藥物功能性篩檢。

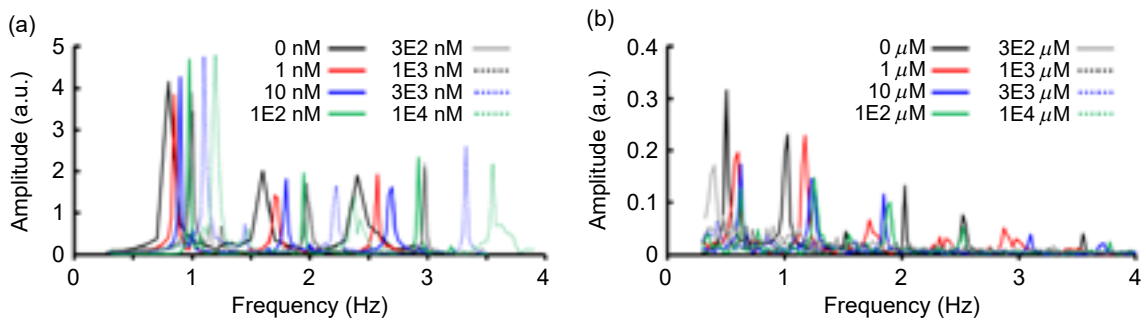


圖 7. 心肌細胞在施加不同藥劑量的 Isoproterenol 訊號波形 (a) 及 Metoprolol 訊號波形 (b) 在頻譜上的分析結果⁽¹⁸⁾。

圖 8(a) 及圖 8(b) 為使用心臟壓電耦合系統進行 Isoproterenol 藥物功能性篩檢的分析結果，分別為收縮頻率及力量，Isoproterenol 藥物的 S 曲線可清楚地被分析出定量出來，並可用以求得 Isoproterenol 藥物在收縮頻率及施力強度的 EC_{50} 值，圖 8(c) 為分析後的結果，分別為在三種培養基材上所培養出的心肌所測得知 Isoproterenol 的頻率 EC_{50} 值及力量 EC_{50} 值，在 FN、FN/HU 和 GL/HU 上的心肌組織所量測到的的頻率 EC_{50} 分別為 109.7 nM、191.1 nM 和 424.8 nM，力量 EC_{50} 則分別為 57.1 nM、121.8 nM 和 157.8 nM，此量測值與之前的報告值在同一範圍。

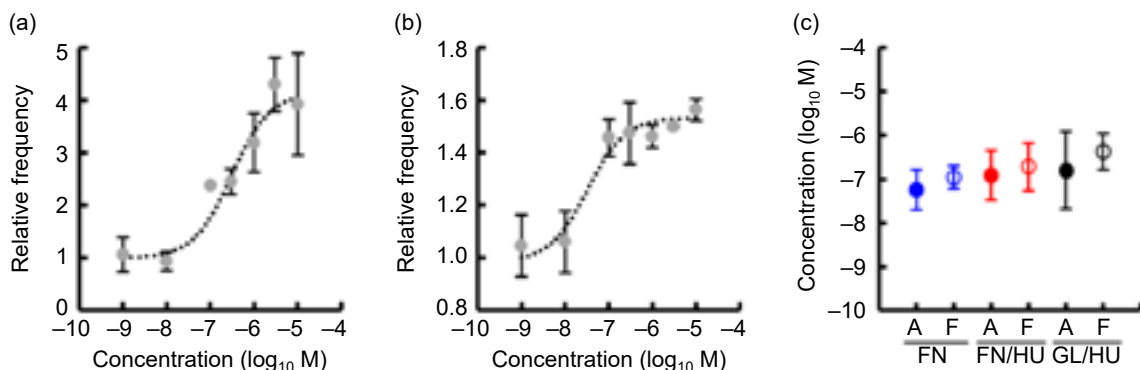


圖 8. Isoproterenol 的收縮頻率 (a) 及強度 (b) S 曲線量測結果，及使用在不同基質表面的心肌組織定量出的頻率 EC_{50} 及強度 EC_{50} 值⁽¹⁸⁾。

圖 9(a) 及圖 9(b) 為使用心臟壓電耦合系統進行 Metoprolol 藥物在收縮頻率及強度的功能性篩檢分析結果，Metoprolol 藥物的 S 曲線亦可清楚地被分析出來。圖 9(C) 為使用在 FN、FN/HU 和 GL/HU 上的心肌組織所量測到的頻率 IC_{50} 及力量 IC_{50} ，分別為 164.7 nM、111.0 nM、及 231.6 nM，與 392.6 nM、419.5 nM 及 167.0 nM，此量測值與之前的報告值亦在同一範圍。

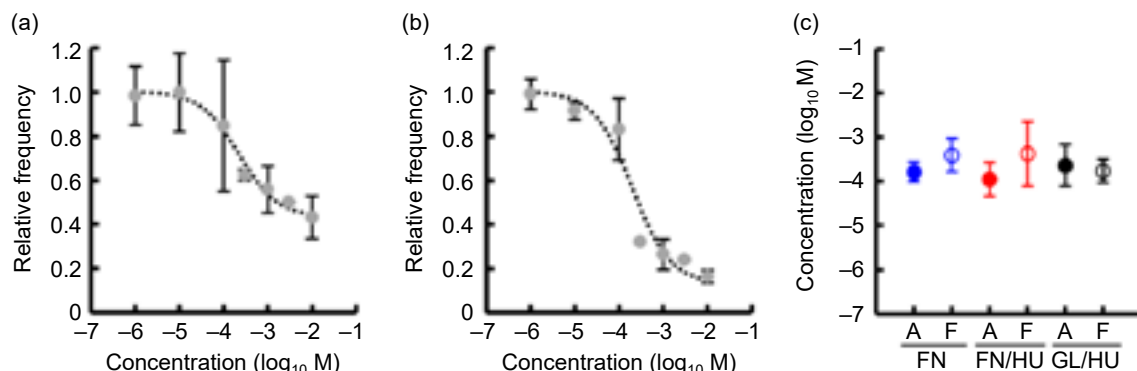


圖 9. Isoproterenol 的收縮頻率 (a) 及強度 (b) S 曲線量測結果，及使用在不同基質表面的心肌組織定量出的頻率 EC₅₀ 及強度 EC₅₀ 值⁽¹⁸⁾。

六、結論

本團隊所開發的心臟壓電耦合系統提供一種創新的心臟藥物篩檢的檢測方法，此系統使用創新的壓電薄膜作為培養基材，並使用微溝槽結構及電刺激微生理裝置，提供可促進心肌組織在七天左右的培養時間內達到足夠成熟且同步之心肌組織，並可進行藥物功能性篩檢的實驗。此心臟壓電耦合系統以同心圓微溝槽結構引導心肌細胞以同心圓的方式進行排列，並發展出同心圓的心肌組織，使其在同步收縮時產生一種向心收縮的彎矩，再藉由圓形的培養腔室設計，以及圓形固定端的邊界條件設計，讓心肌施力收縮訊號可以經由壓電效應轉成電子訊號並進行定量，排除一般使用懸臂量當感測結構所遇到之因心肌組織不規則排列造成扭轉之不確定收縮訊號，而會以彎曲形變為主要的形變，使得心肌的收縮強度訊號可以進行定量。本研究以市售心臟藥物 Isoproterenol (異丙腎上腺素) 和 metoprolol (美托洛爾) 驗證此心臟壓電耦合系統的篩藥功能，並成功以心臟壓電耦合系統在不同藥物濃度下所量測到的收縮施力特性曲線來定量出藥物的 EC₅₀ 值 IC₅₀ 值。總結，此心臟壓電耦合系統不但可針對藥物對心肌組織收縮頻率及力量分別進行定量，並具有開發成全自動化之心臟藥物功能及心臟毒性篩檢的大型陣列系統，將可有效縮短藥物開發的時間及降低成本。除此之外，此系統具有提供體外人類心臟模型的優勢，將可作為替代動物模型的臨床前心臟模型系統。

參考文獻

1. D.A. Tagle, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **48**, 146 (2019).
2. T. Kamakura, T. Makiyama, K. Sasaki et al., *Circulation J.*, **77**, 1307 (2013).
3. Y. S. Zhang, J. Aleman, A. Arneri et al., *Biomed. Mater.*, **10**, 034006 (2015).
4. J. U. Lind, T. A. Busbee, A. D. Valentine et al., *Nat. Mater.*, **16** (3), 303 (2017).
5. J. U. Lind, M. Yadid, I. Perkins et al., *Lab Chip*, **17**, 3692 (2017).
6. J. Kim, J. Park, K. Na et al., *J. Biomech.*, **41** (11), 2396 (2008).
7. S. S. Nunes, J. W. Miklas, J. Liu et al., *Nat. Methods*, **10** (8), 781 (2013).
8. Y. Xiao, B. Zhang, H. Liu et al., *Lab Chip*, **14** (5), 869 (2014).
9. A. Grosberg, A. P. Nesmith, J. A. Goss et al., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **65** (3), 126 (2012).
10. A. Grosberg, P. L. Kuo, C. L. Guo et al., *PLoS Comput. Biol.*, **7** (2), e1001088 (2011).
11. A. Salameh, A. Wustmann, S. Karl et al., *Circ. Res.*, **106** (10), 1592 (2010).
12. D. S. Lee, J. H. Chen, D. J. Lundy et al., *Cell Rep.*, **12** (12), 1960 (2015).

13. W. H. Zimmermann, K. Schneiderbanger, P. Schubert et al., *Circ. Res.*, **90** (2), 223 (2002).
14. Y. C. Chan, S. Ting, Y. K. Lee et al., *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, **6** (6), 989 (2013).
15. E. Holt, P. K. Lunde, O. M. Sejersted and G. Christensen, *Basic Res. Cardiol.*, **92** (5), 289 (1997).
16. T. B. Johnson, R. L. Kent, B. A. Bubolz and P. J. McDermott, *Circ. Res.*, **74** (3), 448 (1994).
17. M. Radisic, H. Park, H. Shing, T et al., *Proc. Natl.Acad. Sci. U. S. A.*, **101** (52), 18129 (2004).
18. Y.-H. Huang, C.-F. Yang, Y.-H. Hsu, *Lab Chip*, **20**, 3423 (2020).
19. D. S. Lee, J. H. Chen, D. J. Lundy, et al., *Cell Rep.*, **12** (12), 1960 (2015).

作者簡介

陳冠維先生為國立臺灣大學應用力學所碩士班學生。

Kuan-Wei Chen is currently a M.S. student in the Institute of Applied Mechanics at National Taiwan University.

黃筠涵小姐為國立臺灣大學應用力學所碩士。

Yun-Han Huang received her M.S. in the Institute of Applied Mechanics at National Taiwan University.

楊秋鳳小姐為國立臺灣大學應用力學所碩士。

Chiou-Fong Yang received her M.S. in the Institute of Applied Mechanics at National Taiwan University.

許聿翔先生為加州爾灣分校醫學工程博士，現為國立臺灣大學應用力學所副教授。

Yu-Hsiang Hsu received his Ph.D. in Biomedical Engineering from University of California, Irvine. He is currently an Associate Professor in the Institute of Applied Mechanics at National Taiwan University.