

利用微生理類器官微流體系統建立肝臟安全性及代謝模型

Building a Liver Safety and Metabolism Model by MPS Organoid Microfluidic Systems

趙柔雅、余昊翰、洪明秀、曾繁根

Rou-Ya Zhao, Hao-Han Yu, Ming-Shiu Hung, Fan-Gang Tseng

隨著科技的快速發展與倫理意識的提升，全球對動物實驗替代方法的需求日益增加。本研究發展一套可重組式模組化多器官晶片平台，以單一雙腔室晶片單元為基礎，透過上下獨立微流道與多孔膜分隔培養區，支援靜態培養及雙向動態灌流；多個晶片單元可依需求組成線性或矩陣式陣列，並透過流體串接建立多器官系統。研究以肝臟與腫瘤晶片為示範，建立肝臟-腫瘤器官晶片模型，探討肝臟代謝、腫瘤負荷與抗癌藥物反應之間的交互作用。結果顯示，雙腔室多孔膜架構可提升肝細胞尿素生成，而調整肝臟與腫瘤細胞比例則可改變 Regorafenib (REG) 的藥效與肝細胞毒性。此平台具備可重組、可擴充及可調整器官比例等特色，可作為多器官藥物評估與精準用藥研究之微生理系統。

With the rapid advancement of technology and the growing need for alternatives to animal testing, this study developed a reconfigurable modular multi-organ-on-chip platform based on a bicompartmental chip unit. The unit contains independent upper and lower microfluidic channels separated by a porous membrane and supports both static culture and bidirectional dynamic perfusion. Multiple units can be assembled into linear or matrix arrays and interconnected to construct customised multi-organ systems. As a proof of concept, liver and tumour chips were integrated to investigate the interactions among hepatic metabolism, tumour burden, and anticancer drug responses. The results showed that the dual-chamber membrane architecture enhanced hepatic urea secretion, while varying the liver-to-tumour cell ratio altered the efficacy of Regorafenib (REG) and hepatotoxic responses. The modular platform therefore provides a reconfigurable and scalable microphysiological system for multi-organ drug evaluation and precision medicine research.

一、組合式器官晶片應用於細胞培養

1.1 器官晶片應用於細胞培養之關聯性

微生理系統 (microphysiological systems, MPS) 是一種整合微流體技術、組織工程與細胞

生物學的創新平台，可在體外模擬人類器官的生理功能，為動物實驗提供高效且具倫理性的替代方案。在臺灣，微流體技術與生醫晶片的發展逐漸成熟，尤其是體外肝臟模型作為藥物篩選與毒性評估的重要平台，契合了 3R 政策的核心理念，成為藥物開發與毒性測試領域的研究重點。

相較於動物模型，器官晶片平台具有明顯的優勢。動物模型雖可進行整體性研究，支持長期深入的臨床轉化研究，並擁有豐富的既有數據，但也存在物種差異性、倫理道德顧慮、昂貴成本與有限的人類相關性等不足。器官晶片通過模擬人體微環境，能顯著提高模型的人類相關性，甚至構建個體化模型。同時，它可用於構建高通量篩選平台，降低動物模型的研發費用，並在生醫藥研究中實現減量和替代動物實驗的目標。此外，器官晶片在藥物篩選中已成功用於毒性事件的預測，例如心血管、肝臟或皮膚毒性，並能識別脫靶效應，為藥物重新設計提供依據，從而減少對患者的潛在風險並降低開發成本。尤其是具有微流體的多器官脈管系統，能適用於標靶藥物開發中脫靶效應的臨床前毒性測定，顯示出巨大的應用潛力。

1.2 利用組合式器官晶片作為培養細胞之平台：

本研究以 Transwell 之雙腔室概念為基礎，結合微流體技術建構上下獨立流道與多孔膜分隔之單元，以克服傳統 Transwell 僅能進行靜態培養、無法重現體內動態流體剪切力之限制，並可依實驗需求以「mix-and-match」方式組合成線性陣列或矩陣陣列，進一步建立不同器官組合及器官比例的多器官晶片系統。

透過上下獨立流道與持續灌流系統，使培養液能穩定流經細胞培養區域，模擬體內血液循環與組織間的物質傳輸過程，進而提供更具生理相關性的細胞生長環境，提升體外模型對器官功能與藥物反應的模擬能力。為能夠自由組合型的晶片，在操作時可依不同需求搭配不同數量的晶片並予以組裝結合。單一晶片由上晶片與下晶片構成，上晶片下方以熱壓方式貼合 PETE 多孔膜，此多孔膜之目的在於培養器官組織，提供交換物質之環境，並可同時透過上、下晶片的流道分別接觸到培養液。於使用時在四個角落，從下晶片往上晶片方向以平口螺絲栓緊，由於上晶片下側之外圍鑲嵌有 O-ring，螺絲栓緊的同時也可侷限下晶片流道空間的液體，如圖 1 淺藍色所示。於此同時，下晶片流道可透過側邊的銜接孔位與其他晶片進行橫向串聯，讓橫向流道內之液體同時流通 PETE 的下方(下晶片流道空間)。同理，如圖 1 淺橘色所示，上晶片流道可透過側邊的銜接孔位與其他晶片進行縱向串聯，讓縱向流道內之液體同時流通 PETE 的上方(上晶片流道空間)。晶片組裝完成之後，可於四周的銜接孔位扣上彈性皮套避免液體洩漏，並於正上方壓緊 clamp 用以注入流體(如圖 1 淺灰色所示)。晶片銜接孔位埠會套上合適的 O-ring (藍色小點) 以避免組裝介面的洩漏。

1.3 實驗

使用組合式器官晶片作為雙層細胞 (HepG2/C3A 及 HUVEC-sVAP-1) 的培養支架，先分別在多孔 PET 膜兩側接種 HUVEC-sVAP-1 與 HepG2/C3A，形成雙層細胞結構。細胞接種前分別以 CellTracker™ Green CMTPX Dye 及 CellTracker™ Red CMTPX Dye 標記，並使用 Confocal microscope LSM-780 觀察。結果顯示兩種細胞均可穩定附著於多孔膜上下兩側，證實此模組化晶片可作為雙側細胞培養與器官晶片建構平台。

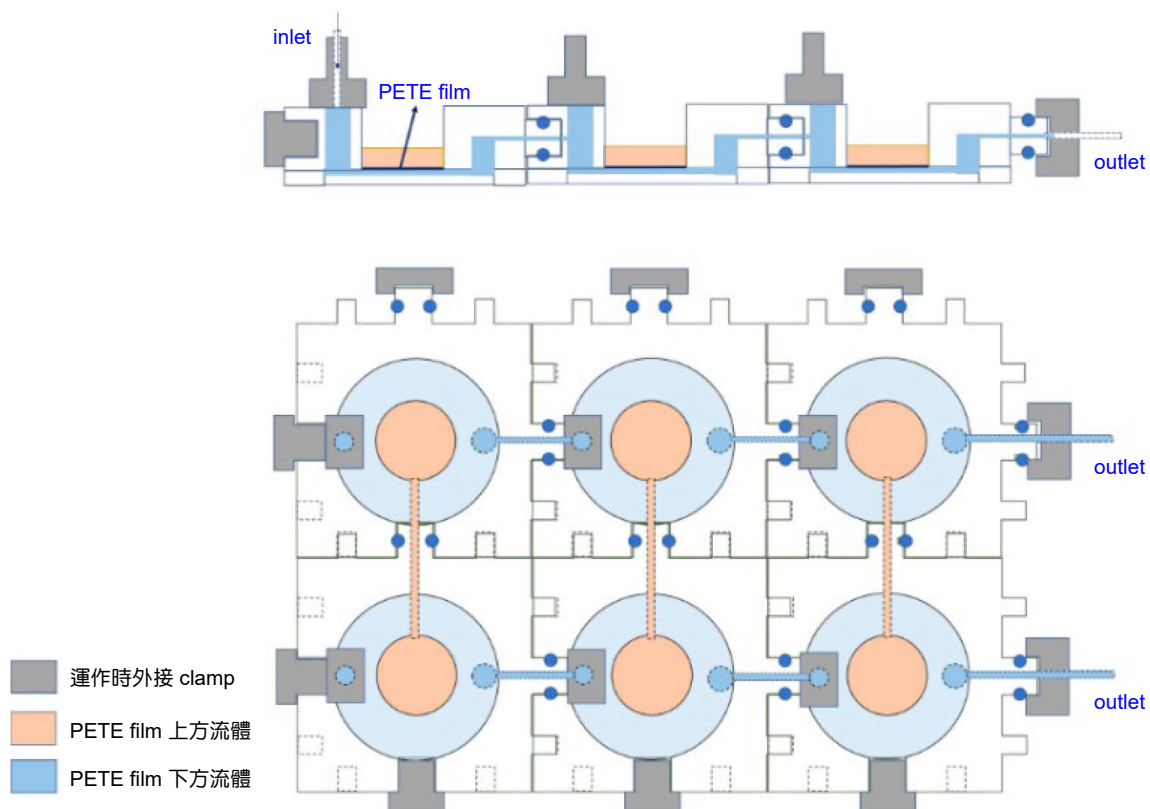


圖 1. 組合式器官晶片概念示意圖。

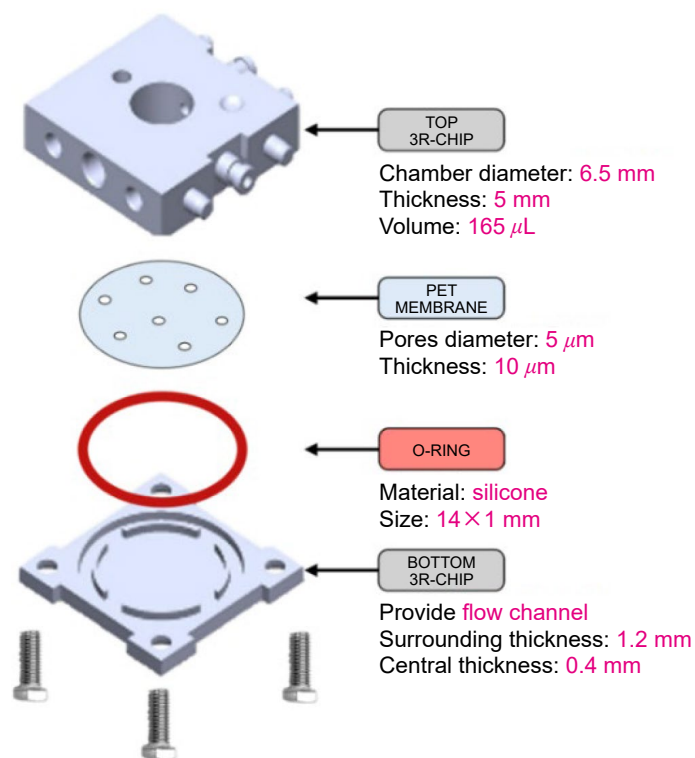


圖 2. 組合式器官晶片裝置系統組成示意圖。

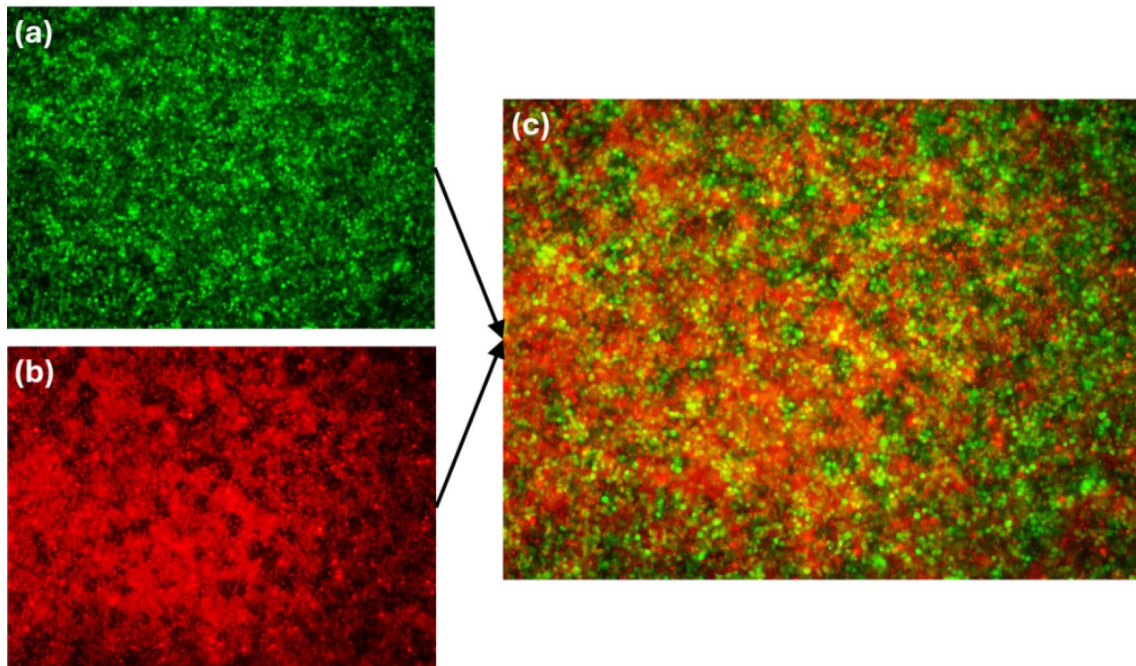


圖 3. 使用螢光顯微鏡拍攝組合式器官晶片之雙層細胞結構。(a) HUVEC-sVAP-1 (b) HepG2/C3A 及 (c) 雙層細胞結構。

二、組合式器官晶片應用於肝臟代謝功能檢測

2.1 微流控細胞培養平台與肝臟代謝功能檢測之關聯性

肝臟為人體維持代謝解毒、蛋白質合成與體內平衡之核心器官。於臨床醫學與藥物評估中，通常以血清白蛋白的分泌水平以及尿素循環的運作效率，作為評估肝細胞合成解毒功能的重要功能性指標。在慢性肝病或受損的肝細胞中，白蛋白合成量常因功能受損而顯著降低⁽¹⁾，且其分子結構之改變亦會導致運輸能力衰退；而尿素循環亦會因功能受損而受阻，無法有效將具備細胞毒性的體內氨轉化為尿素，進而引發血氨過高及肝性腦病等嚴重併發症⁽²⁾。因此，精準監測此兩項代謝指標之變動，對於肝臟疾病診斷與藥物毒性管理具有關鍵意義。

然而，傳統體外平面培養模型往往缺乏體內微環境的動態刺激。先前的研究中證實，透過微流控細胞培養平台能高度模擬肝臟的複雜細胞結構與生理微環境⁽³⁾。此類器官晶片不僅能精準再現內皮細胞的窗孔結構 (fenestrae) 以及血液與肝細胞間的動態物質交換，亦能顯著提升肝細胞分泌白蛋白、合成尿素及細胞代謝酶 (如 CYP450) 之活性表現⁽³⁾。此外，在細胞免疫反應研究中，該平台亦能高精度重現中性白血球 (neutrophils) 從捕獲、附著到在內皮層爬行之完整招募響應行為，成為探討肝發炎或纖維化等病理機轉的理想體外平台⁽³⁾。

因此，利用微流控細胞培養平台建構仿生動態環境，能有效進行肝臟代謝功能之高效檢測，進而精準評估外源性藥物毒性所誘發之肝損傷程度。

2.2 利用 HepG2/C3A 細胞與 HUVEC-sVAP-1 作為仿生肝臟

在組合式器官晶片中將人類肝癌細胞 HepG2/C3A 6 萬顆接種於上層，並將人類臍靜脈內皮細胞 HUVEC-sVAP-1 5 萬顆接種於下層，靜置培養至貼附穩定並形成單層結構後，分別於靜態條件下進行未加藥、5-Fluorouracil (5-FU) 與 Regorafenib (REG) 處理，並培養 72 小

時，觀察尿素 (Urea) 合成與 CYP3A4 活性。另以傳統 96 孔盤作為比較平台。研究進一步顯示，在無藥物條件下，模組化晶片與 96 孔盤的細胞增殖、存活率及 CYP3A4 活性大致相當，但晶片中的尿素分泌量顯著較高，顯示雙腔室與多孔膜所形成的雙側物質交換環境可能有助於維持肝細胞合成功能。⁽⁴⁾

2.3 實驗

2.3.1 尿素檢測

在培養 72 小時時使用 Urea Assay Kit II (Abcam) 測量不同細胞數及藥物組別的細胞上清液 Urea 濃度。如圖 4 所示，未加藥組具有最高的 Urea 產量，約為 50 μg ；5-FU 組約下降至 25 μg ；REG 組約為 40 μg 。相較於傳統 96 孔盤，組合式晶片之 Urea 表現較高。根據研究，作者推測此差異可能與雙腔室架構提供雙側物質傳輸、較大的下層培養液儲存空間及較短的氧氣擴散距離有關；然而，細胞極化與尿素生成改善之間的直接關係仍需透過極性蛋白標誌與轉錄體分析進一步驗證。⁽⁴⁾

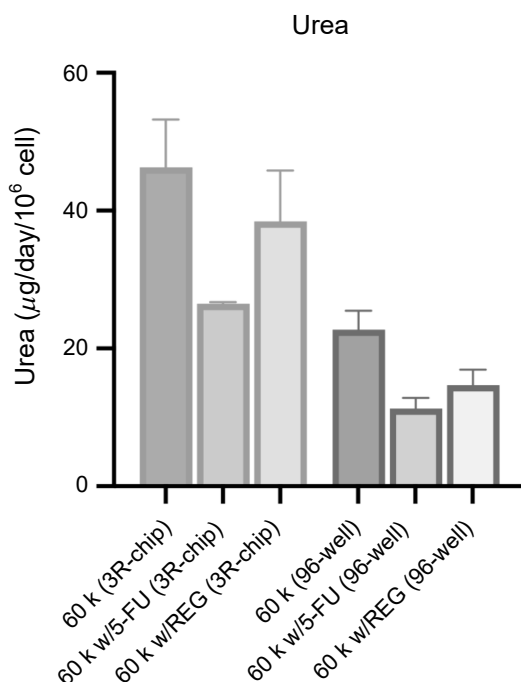


圖 4. HepG2/C3A 細胞於不同培養平台及藥物處理下之尿素分泌表現量。

2.3.2 細胞代謝酶 CYP3A4 之活性表現

為了解不同培養平台對 HepG2/C3A 細胞 CYP3A4 活性的影響，使用 P450-Glo™ CYP3A4 Assay Kit (Promega) 進行分析。實驗以 6 萬顆細胞培養 72 小時後，測定細胞 CYP3A4 活性，並比較模組化晶片與傳統 96 孔盤之間的差異。

由實驗結果可知，模組化晶片與傳統培養孔板的細胞增殖情形相近圖 5，且兩種平台的細胞存活率與 CYP3A4 活性亦無顯著差異。然而，肝細胞在模組化晶片中的尿素分泌量則顯著高於傳統培養孔板，顯示兩種平台雖具有相近的細胞生長、存活及基礎 CYP3A4 代謝能力，但模組化晶片可能更有利於部分代謝功能的維持。

由於本實驗是在靜態培養條件下進行，且兩種平台上層培養區的培養液體積相同，因此尿素分泌量的差異可能與模組化晶片的雙腔室結構及多孔膜介面有關。在傳統 96 孔盤中，細胞直接培養於不具通透性的塑膠表面，營養物質供應及代謝物交換主要侷限於細胞的頂端側；相較之下，模組化晶片利用多孔膜作為上下腔室之間的介面，使細胞可進行雙側的物質傳輸與擴散。

此外，下方腔室最多可提供 250 μL 的培養液空間，不僅增加細胞可利用的整體營養來源，也可作為代謝副產物的額外容納空間。此種雙腔室配置可能有助於降低局部代謝物累積所造成的抑制作用，進而維持較高的尿素循環活性。另一方面，多孔膜亦可縮短下方腔室氧氣向細胞擴散的距離，可能改善傳統靜態 96 孔盤深孔結構所造成的氧氣供應限制。

整體而言，模組化晶片與傳統培養孔板具有相近的 CYP3A4 活性，顯示兩種平台的基礎異生物質代謝能力並無明顯差異；然而，模組化晶片中的尿素分泌量顯著提升，則顯示其雙腔室與多孔膜結構可能為肝細胞的代謝與生合成作用提供較佳的微環境。

未來可進一步導入細胞極性相關的頂端側／基底外側 (apical/basolateral) 蛋白質標誌，以及轉錄體分析，以更明確地確認細胞於此微環境中的極化程度，並進一步釐清模組化晶片提升尿素生成能力的可能原因。⁽⁴⁾

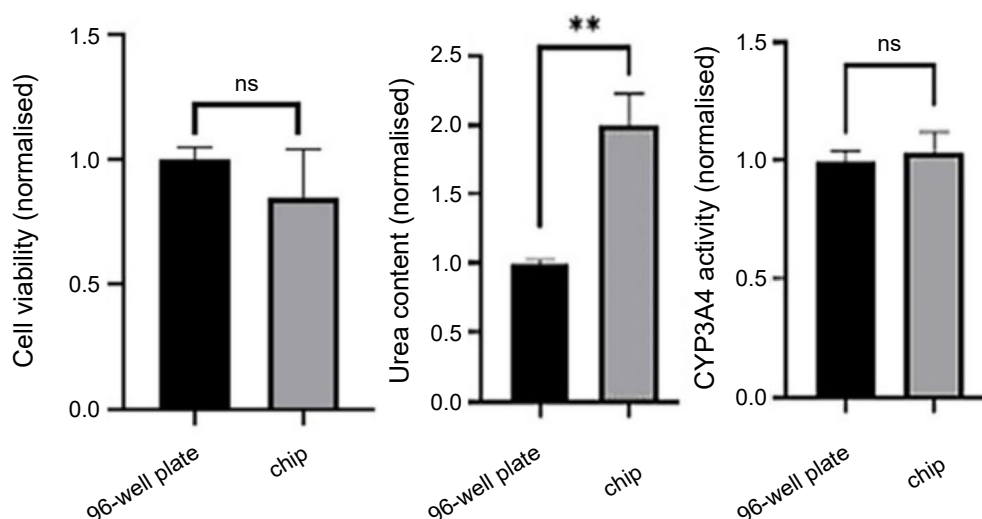


圖 5. HepG2/C3A 細胞於 96 孔盤與器官晶片平台之細胞存活率、尿素生成量及 CYP3A4 活性比較。

三、組合式器官晶片應用於腫瘤藥物反應之調控

3.1 微流控細胞培養平台與腫瘤藥物反應調控之關聯性

生物物理環境是腫瘤微環境 (tumor microenvironment, TME) 中的重要組成部分之一，包含了剪應力 (shear stress)、壓力梯度與流體流動等物理刺激。隨著微流體與器官晶片技術的發展，研究人員得以於體外模擬真實的血流與剪力環境，進一步觀察其對腫瘤細胞遷徙、轉移與藥物反應的影響，與傳統靜態細胞培養系統相比，動態微流體晶片具備可控流體灌流與剪力模擬能力，可更真實反映體內血管環境⁽⁴⁾。

3.2 利用 HT29 與 HUVEC 細胞作為腫瘤晶片與肝臟晶片串接

在組合式器官晶片中將人類結直腸癌細胞 HT-29 接種於上層，並將 HUVEC 內皮細胞接種於下層，靜置培養至貼附穩定後，組裝晶片並接入蠕動幫浦驅動的流體循環系統，於動態灌流條件下進行觀察。模組化晶片可在垂直與水平方向串接，使上、下流道分別傳遞流體。以螢光微粒追蹤流場，於 0.3 rpm、2 mm 內徑管路條件下，量測晶片不同位置之流速約為 114.5-241.65 $\mu\text{m/s}$ ；入口與出口流速較高，中央區域較低。依實測流速估算，下層腔室細胞可受到接近靜脈生理範圍的剪應力，顯示此平台具有提供生理相關動態流體環境的潛力。⁽⁴⁾

3.3 實驗

在組合式器官晶片中將 5 萬顆 HT-29 細胞接種於上層，並將 HUVEC 內皮細胞接種於下層，靜置培養至貼附穩定後，組裝晶片並接入蠕動幫浦驅動的流體循環系統，加入 Regorafenib (REG) 進行動態灌流，為了在多器官串接實驗中建立精準之細胞比例，調整肝臟細胞接種量為 5 萬顆。本研究固定每個肝臟晶片為 5 萬顆 HepG2/C3A，並將 HT-29 細胞數調整為 6 萬、5 萬、2.5 萬及 1.6 萬顆，建立四種肝臟：腫瘤細胞比例，分別為 1:1.2、1:1、1:0.5 及 1:0.32。以 30 μM REG 動態灌流 24 小時後，利用 CCK-8 評估肝細胞與腫瘤細胞存活率，並以 P450-Glo™ CYP3A4 assay 評估肝細胞代謝功能。結果顯示，腫瘤負荷與 REG 處理會共同影響肝臟 CYP3A4 活性、肝細胞存活率及腫瘤細胞存活率。

四、結論

本研究以組合式器官晶片平台建構肝臟代謝功能模型以及腫瘤模型，並將兩者串接，模擬藥物經肝臟代謝後對腫瘤細胞作用的變化，並評估肝臟雙向交互作用對藥物反應的調節影響。此平台的核心特色在於單一雙腔室晶片單元可支援靜態培養與雙向動態灌流，並能透過模組化串接建立線性或矩陣式多器官系統，進一步調整不同器官或組織之比例。肝臟晶片以 HepG2/C3A 與 HUVEC-sVAP-1 建構，結果顯示其具備尿素與 CYP3A4 等基礎肝臟功能。

在多器官串接實驗中，肝臟與腫瘤細胞比例被設計為 1:1.2、1:1、1:0.5 及 1:0.32 四種條件，並以 30 μM REG 動態灌流 24 小時。結果顯示，未加藥時，肝臟：腫瘤比例越高 (亦即腫瘤細胞越少) CYP3A4 活性越高；加入 REG 後，高腫瘤負荷組 (1:1.2 與 1:1) 的 CYP3A4 活性相較未加藥組顯著上升，而低腫瘤負荷組 (1:0.5 與 1:0.32) 差異較小。同時，REG 處理下腫瘤細胞數增加會伴隨肝細胞存活率下降，顯示器官比例會影響藥物反應。作者推測，高腫瘤負荷下的營養競爭、腫瘤分泌因子或局部藥物分布改變可能參與 CYP3A4 誘導，但目前尚未透過細胞激素分析或 LC-MS/MS 代謝體分析直接證實。

未來，本研究的仿生肝臟晶片將進一步測試更多肝功能性指標，例如 Albumin、UGT1A1/UGT1A9 等，以更完整評估肝臟功能。針對雙腔室架構所造成之尿素生成提升，亦可透過 ZO-1、MRP2 等極性相關蛋白染色及轉錄體分析，進一步確認細胞極化與功能改善之關係。

在肝臟－腫瘤串接模型中，將使用 LC-MS/MS 分析實驗後培養基中的 REG、M-2、M-5 等成分，直接驗證肝臟代謝與腫瘤藥物反應之關係。Analyst 指出 REG 可經 CYP3A4

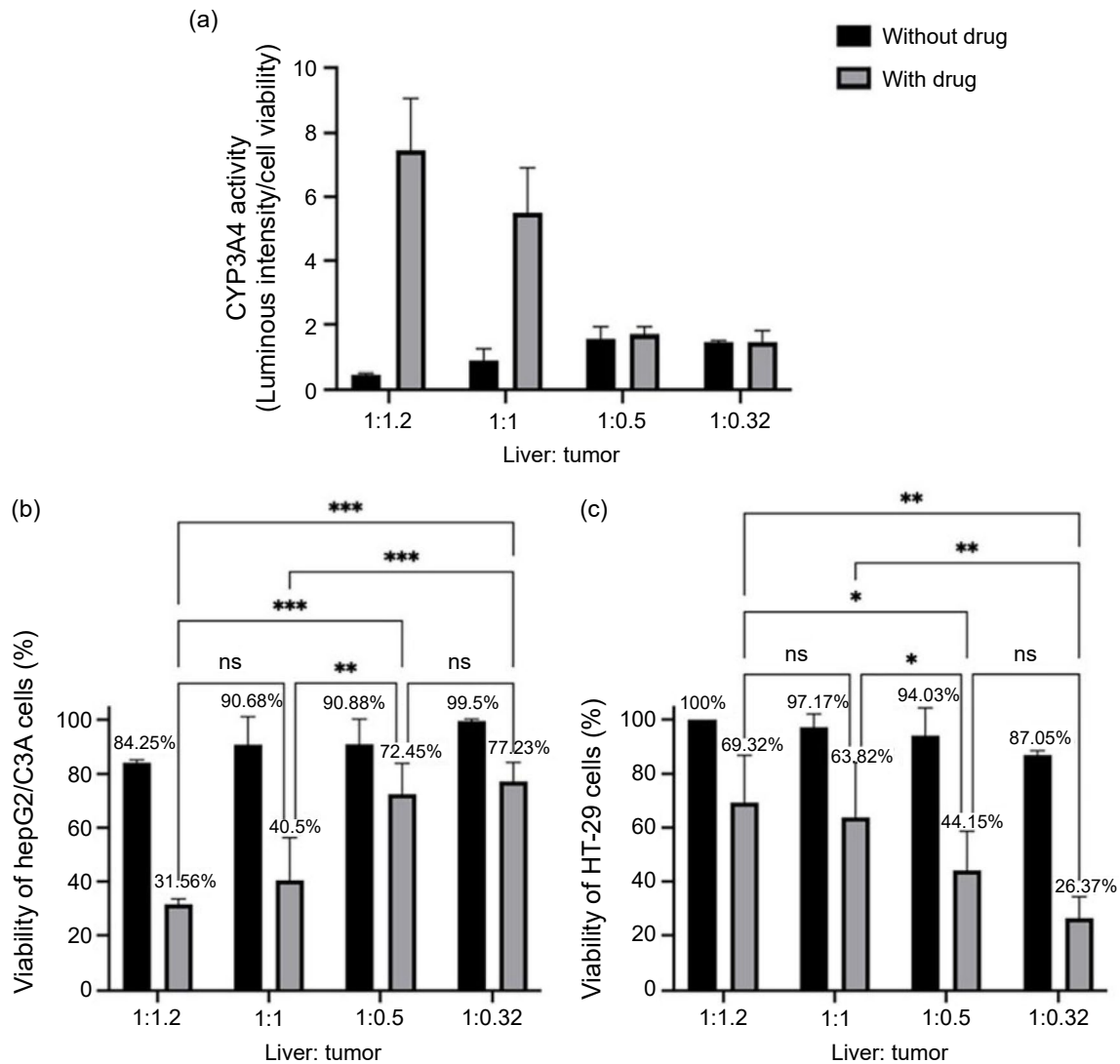


圖 6. 肝臟－腫瘤串接晶片於不同細胞比例下之藥物反應與存活率分析 (a) 肝細胞 CYP3A4 活性分析 (b) 肝細胞存活率 (c) 腫瘤細胞存活率。

代謝形成具有藥理活性的代謝物，但目前相關推論仍主要來自細胞存活率與 CYP3A4 等終點分析，尚缺乏直接代謝體證據。此外，可導入薄膜電化學感測器或奈米感測器，進行 Albumin、CYP 活性與藥物濃度的即時、非破壞性監測，並進一步將晶片出口與 LC-MS/MS 串接，建立線上代謝物分析系統。

基於組合式器官晶片的多器官串接特點，未來將進一步增加腎臟晶片，建立肝臟－腎臟及肝臟－腎臟－腫瘤等複合模型，並可延伸至 gut-liver、tumour-immune 等更複雜的器官交互作用。同時，可透過微結構培養腔促進 3D spheroid 或 organoid 形成，使模型更接近真實組織；並系統性分析與最佳化灌流參數及剪應力，以提升平台在藥物動力學、毒性預測與精準藥物篩選上的應用價值。

五、誌謝

本研究感謝國家科學及技術委員會 (NSTC) 3R 計畫 (NSTC 114-2321-B-007-001)、國家衛生研究院 (NHRI) 晶創計畫 (115-1401-01-30-04、114-1401-01-30-05)，以及國立清華大學－國家衛生研究院合作計畫「國立清華大學種子計畫」(112F7MDIE1)，並獲教育部高等教育深耕計畫支持。

參考文獻

1. Nijin Wu *et al.*, *Molecular Medicine Reports*, **29** (2), (2024).
2. Wang, H., J. Ran, and T. Jiang, *Subcell Biochem*, **73** (7), 7 (2014).
3. Xiaojun Zhang *et al.*, *Cancers* (Basel), **14** (3), 348 (2022).
4. Yun-Jie Hao *et al.*, *Analyst*, **151** (16), 4628 (2026).

作者簡介

趙柔雅女士現為國立清華大學工程與系統科學系碩士生。

Rou-Ya Zhao is currently a M.S. student in the Department of Engineering and System Sciences at National Tsing Hua University.

余昊翰先生目前為國立清華大學工程與系統科學系博士生。

Hao-Han Yu is currently a Ph.D. student in the Department of Engineering and System Sciences at National Tsing Hua University.

洪明秀女士現為國家衛生研究院生物技術與藥物研究所研究員。

Ming-Shiu Hung received her Ph.D. in Cell and Developmental Biology from Rutgers University, USA. She is currently an Investigator and Associate Director at the Institute of Biotechnology and Pharmaceutical Research, National Health Research Institutes.

曾繁根先生加州大學洛杉磯分校 (UCLA) 機械航空工程博士現為國立清華大學工程與系統科學系講座教授，以及中央研究院應用科學研究中心研究員。

Fan-Gang Tseng received his Ph.D. in Mechanical Engineering from the University of California, Los Angeles (UCLA). He is currently a Chair Professor in the Department of Engineering and System Sciences at National Tsing Hua University and a Research Fellow at the Research Center for Applied Sciences, Academia Sinica.