

分类号： 0652.9；TP212.3

单位代码： 10431

密 级： 公开

学 号： 10431210076

齊魯工業大學

硕士学位论文

(专业学位)

基于环境氧对流扩散模型的肝分区芯片研制
及应用

作 者 姓 名 _____ 王宇申

领 域 _____ 机械工程

所 在 学 部 _____ 机械工程学部

指导教师姓名 _____ 王力、陈俊

专业技术职务 _____ 教授、讲师

2024 年 05 月 25 日

**A Thesis Submitted for the Application of
the Master's Degree of Engineering**

**Development and Application of a Liver
Zonation Chip Based on an Environmental
Oxygen Convection-Diffusion Model**

Candidate: Wang Yushen

Specialty: Mechanical Engineering

Supervisor: Professor Wang Li, Lecturer Chen Jun

**Qilu University of Technology, Jinan, China
May, 2024**

目 录

第 1 章 绪论.....	1
1.1 肝脏结构与体外模型.....	1
1.1.1 肝脏的生理结构.....	1
1.1.2 肝脏的细胞组成.....	1
1.1.3 肝脏体外模型的发展进程.....	2
1.2 肝器官芯片的仿生研究现状	2
1.2.1 肝脏结构模拟：肝窦与肝小叶.....	2
1.2.2 肝脏细胞模拟：多细胞共培养.....	4
1.2.3 肝脏物理化学参数模拟：氧气和剪切应力	6
1.3 肝器官芯片的应用.....	7
1.4 基于肝器官芯片的多器官芯片	8
1.5 挑战和未来方向.....	9
1.6 课题研究意义与主要内容	10
第 2 章 肝分区芯片的设计制备及仿真分析	12
2.1 引言.....	12
2.2 实验部分.....	13
2.2.1 制备肝分区芯片的实验材料和设备	13
2.2.2 肝分区芯片的制造.....	14
2.2.3 肝分区芯片内的流体流动计算模拟	14
2.2.4 肝分区芯片内的物质扩散(氧气、葡萄糖)计算模拟.....	15
2.2.5 肝分区芯片内的氧梯度验证.....	16
2.2.6 肝分区芯片内的粒子图像测速.....	16
2.2.7 肝分区芯片内的养分扩散实验.....	16
2.3 结果与讨论.....	17
2.3.1 肝分区芯片的设计灵感及结构功能	17
2.3.2 肝分区芯片中氧梯度的构建.....	18
2.3.3 肝分区芯片中灌流速度的确定.....	19
2.3.4 肝分区芯片中的流体剪切应力影响	20
2.3.5 肝分区芯片中的营养物质扩散程度	22
2.4 本章小结.....	23
第 3 章 肝分区芯片中的细胞生长状态以及 NAFLD 的构建.....	24
3.1 引言.....	24
3.2 实验部分.....	24
3.2.1 细胞培养/种植的实验材料和设备	24

3.2.2 细胞培养和种植.....	26
3.2.3 细胞活力测定.....	26
3.2.4 细胞形态分析.....	26
3.2.5 细胞免疫染色和成像.....	26
3.2.6 细胞功能分析.....	27
3.2.7 NAFLD 的诱导	27
3.2.8 细胞脂滴染色.....	27
3.3 结果与讨论.....	27
3.3.1 肝分区的形貌还原.....	27
3.3.2 肝分区的异质性功能实现.....	29
3.3.3 寻找 FFAs 合适的浓度和诱导时间构建 NAFLD 模型	30
3.3.4 NAFLD 下的细胞形貌改变	33
3.3.5 NAFLD 下的细胞功能影响	34
3.4 本章小结.....	35
第 4 章 肝分区芯片集成 ALT 传感器探究 NAFLD 的干预机制 ...	36
4.1 引言.....	36
4.2 实验部分.....	36
4.2.1 制备基础传感器以及疾病机制探究的材料和设备	36
4.2.2 ALT 传感器的制备	37
4.2.3 ALT 传感器的修饰	38
4.2.4 ALT 传感器的校准	38
4.2.5 ALT 释放的动态监测	38
4.2.6 ALT 传感器的准确性验证	38
4.2.7 ROS 检测	39
4.3 结果与讨论.....	39
4.3.1 ALT 传感器的检测原理和标定	39
4.3.2 ALT 传感器的一致性和稳定性	40
4.3.3 动态监测 NAFLD 诱导的细胞损伤	41
4.3.4 氧梯度对于 NAFLD 进程的调控	41
4.3.5 探究 NAFLD 进程的干预机制	43
4.4 本章小结.....	46
第 5 章 仿生肠-肝器官芯片评估聚苯乙烯微塑料的转运、吸收和损伤	47
5.1 引言.....	47
5.2 实验部分.....	48
5.2.1 肠-肝器官芯片检测微塑料的实验材料和设备	48
5.2.2 肠-肝器官芯片的制作	49
5.2.3 微塑料颗粒的灌流.....	49

5.2.4 Caco-2 和 HepaRG 细胞培养	49
5.2.5 肠-肝器官芯片内的细胞种植	49
5.2.6 Caco-2 细胞的转运率检测	50
5.3 结果与讨论	50
5.3.1 肠-肝器官芯片的构建	50
5.3.2 肠-肝器官芯片灌流速度和循环气压确定	51
5.3.3 肠-肝器官芯片重建肠道-肝脏微环境	52
5.3.4 微塑料在肠道中的摄取和肝脏损伤	54
5.3.5 肠道蠕动对于肝损伤的保护作用	56
5.4 本章小结	57
第 6 章 总结与展望	58
6.1 总结	58
6.2 展望	58
参考文献	60

摘 要

肝脏是人体最大的内脏器官，具有复杂的微结构和功能，在药物代谢中发挥着至关重要的作用。各种药物引起药物性肝损伤（DILI）是导致晚期药物失效的主要原因。此外，肝脏类疾病是全球主要的死因之一，每年都有许多新病例出现。尽管在临床试验之前已经使用动物模型来了解人类药物代谢毒性和疾病进程，但动态微生理系统，如肝器官芯片，可以更好地概括人类肝脏生理和病理特征，因此可以更准确的预测人类结果。肝器官芯片已在药物筛选、疾病建模和再生医学等方面取得了巨大的应用。然而，目前设计的肝芯片在实际生理微环境方面仍存在不足，特别是对于氧浓度梯度环境的构建。氧浓度梯度对于形成肝脏分区以及探索肝脏异质性功能尤为重要。

基于此，本文构建了具有生理氧浓度梯度的肝分区芯片。与常规氧梯度的构建相比，芯片运用了环境氧对流、扩散和消耗的策略，仿生肝窦窗孔的渗透作用和血液流场。实现了贴近在体肝细胞微环境的、可控的氧浓度梯度（3.7%-8.9%）。显微成像和免疫组织化学分析表明，HepaRG 细胞单层成功演化了肝小叶三个分区各自的典型特征（形貌特征：细胞骨架、高度，功能特征：蛋白合成、细胞代谢）。然后，基于肝分区芯片的平台，进行了两方面的应用：

1、探究非酒精性脂肪肝病（NAFLD）的干预机制。在该装置上循环灌流游离脂肪酸（FFAs），诱导建立 NAFLD 模型。脂质堆积随时间呈现非均匀变化，类似于临床表型。同时，集成的谷丙转氨酶（ALT）生物传感器监测结果显示，细胞在氧梯度下比传统静态模型受到更强的损伤。进一步发现了随着芯片内氧梯度区间的增加（1.1%-4.9%, 3.7%-8.9%, 5.6%-12.3%, 8.9%-17.3%），缺氧诱导因子（hif-2 α ）表达减少，减缓细胞间通讯蛋白（ β -catenin）的释放，降低线粒体活性氧（ROS）应激，相应的细胞损伤生物标志物 ALT 分泌减少。

2、探究微塑料（MPs）的转运、吸收和损伤。与具有仿生肠道蠕动的肠器官芯片相结合，并循环灌流 100nm 的 MPs（浓度范围为 0-1 mg/ml）模拟人体口服摄入。发现 1%的肠道蠕动对 MPs 保持 8%的转运率，同时转运后的 MPs 对肝细胞造成氧化应激损伤。此外，随着肠道蠕动的增加（0%，1%，3%，5%），MPs 的转运率下降，肝细胞的氧化应激和损伤程度相应下调。

本文设计的肝分区芯片为体外研究肝脏分区功能以及氧浓度相关的机制提供了良好的平台。该芯片有利于深入的疾病建模，提供可能的治疗靶点以及筛选临床前阶段的潜在候选药物。

关键词：肝分区芯片；生理氧梯度；肝脏分区；非酒精性脂肪肝病（NAFLD）；谷丙转氨酶（ALT）传感器；微塑料（MPs）

ABSTRACT

The liver is the largest internal organ in the human body, possesses a complex microstructure and functionality, playing a crucial role in drug metabolism. Drug-induced liver injury (DILI) caused by various drugs is the main cause of late drug failure. Moreover, liver diseases stand as one of the leading causes of death worldwide, with numerous new cases emerging annually. While animal models have been used to understand human drug metabolism toxicity and disease progression prior to clinical trials, three-dimensional microphysiological systems (such as liver chip) can better recapitulate human liver physiological and pathological characteristics. Consequently, they more accurately predict human outcomes. The liver chip has found tremendous applications in drug screening, disease modeling, and regenerative medicine. However, liver chip still has shortcomings in replicating the actual physiological microenvironment currently designed, especially in constructing oxygen gradient environments. Oxygen gradients are particularly crucial for the formation of liver zonation and the exploration of heterogeneous liver function.

Based on this premise, this thesis constructed a liver-zonation-on-a-chip with a physiological oxygen gradient. Compared to traditional methods, our chip employs the strategy of environmental oxygen convection, diffusion, and consumption, faithfully mimicking the hemodynamics of fenestrated hepatic sinusoids. A controlled physiological oxygen gradient (3.7%-8.9%) was established *in vitro*. HepaRG cells successfully evolved into three zones of the liver lobule, exhibiting each typical features (morphological features: cytoskeleton, height. functional features: protein synthesis, cell metabolism) through microscopic imaging and immunohistochemical analysis. Subsequently, the platform based on the liver partition chip was applied in two aspects:

1. Intervention mechanisms for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) was explored. Free fatty acids (FFAs) were cyclically perfused on the device to induce and establish a NAFLD model. Lipid accumulation exhibits non-uniform changes over time, similar to clinical phenotypes. At the same time, oxygen gradients induce a stronger release of (alanine aminotransferase) ALT, compared to the traditional static model (20% oxygen content) by the biosensor within the chip. It was further found that as the oxygen gradient increased progressively within the chip (1.1%-4.9%, 3.7%-8.9%, 5.6%-12.3%, 8.9%-17.3%), a decrease in the expression of hypoxia-inducible factor-2 α (hif-2 α) was observed. This decelerated the release of β -catenin and attenuated the level of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) stress, the corresponding secretion of cellular damage biomarkers ALT decreased.

2. The transport, uptake, and damage of microplastics (MPs) was explored. Combined with a gut chip mimicking the intestinal peristalsis, and 100nm MPs (concentration range: 0-1 mg/ml) were circulated to simulate oral ingestion in the human body. The study found that 1% intestinal peristalsis maintained an 8% transport rate of MPs, while the transported MPs caused oxidative stress damage to hepatic cells. Additionally, as intestinal peristalsis increased (0%, 1%, 3%, 5%), the transport rate of MPs decreased, while the oxidative stress and damage to hepatic cells correspondingly decreased.

The liver-zonation-on-a-chip designed in this study provides a robust platform for *in vitro* investigation of liver zonation and oxygen concentration-related mechanisms. The chip facilitates in-depth disease modeling, offering potential therapeutic targets and screening of preclinical candidate drugs.

Keywords: Liver-zonation-on-a-chip, Physiological oxygen gradient, Liver zonation, Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), Alanine aminotransferase (ALT) sensors, Microplastics (MPs)

第 1 章 绪论

1.1 肝脏结构与体外模型

1.1.1 肝脏的生理结构

肝脏是人体最大的内脏器官，主要负责胆汁的合成和分泌、内源性和外源性质的解毒、血浆蛋白的合成和排泄、尿素合成以及葡萄糖、铁和维生素的储存^{[1][2]}。肝脏的基本结构功能单位是肝小叶，每个肝小叶整体呈正六边形结构（图 1.1）。由肝动脉、门静脉和胆管组成的三联体位于六边形的顶端，中央静脉处于中心，肝细胞围绕中央静脉呈放射状分布^[3]。肝细胞排列成的一层凹凸不平的板状结构称为肝板，相邻肝板间的空隙称为肝血窦。这是一种由肝窦内皮细胞（LSEC）组成的特殊毛细血管，平均直径为 $10\text{ }\mu\text{m}$ ，长度为 $275\text{ }\mu\text{m}$ ^[4]。LSEC 层包含许多称为开窗的开放孔^[5]，直径在 100 到 1000 纳米之间，类似于血液传播的筛子^[6]。血窦内皮与肝板之间的间隙称为窦间隙，窦间隙是一种薄的、 $1.4\text{ }\mu\text{m}$ 宽的网状基底膜，由纤维连接蛋白、层粘连蛋白、IV 型胶原和 I 型胶原组成^[7]。肝血窦周围的肝细胞将大量微绒毛延伸到窦间隙空间，与血液直接接触，增加了肝细胞与运输物质的有效表面，促进了肝功能的运行。

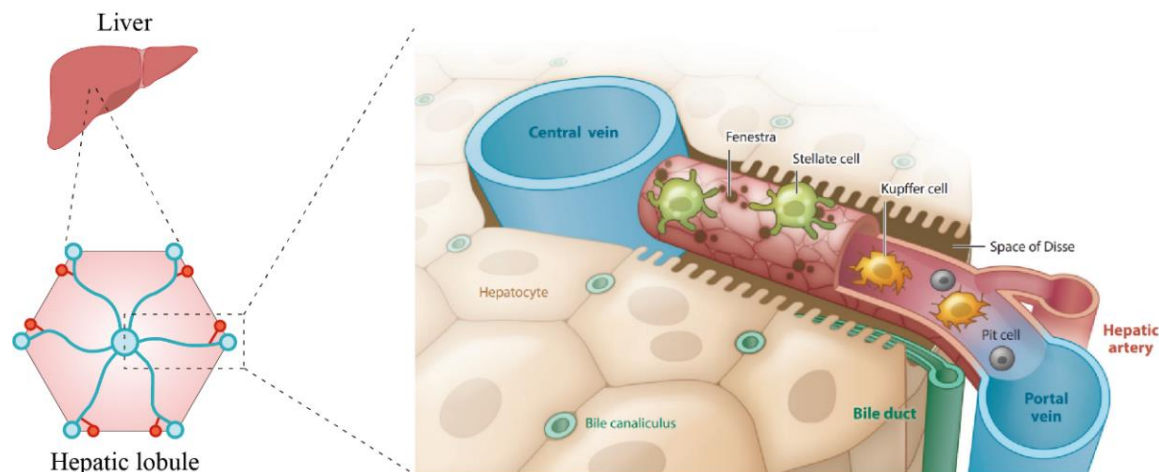


图 1.1 肝小叶以及肝窦结构示意图

1.1.2 肝脏的细胞组成

肝脏细胞主要由实质细胞和非实质细胞组成，其中肝实质细胞是肝脏行使其功能的主要细胞，约占肝脏细胞的 60%^[1]；肝非实质细胞是指不具有肝脏特有功能的细胞，在维持组织结构、调节肝脏代谢和毒性刺激的反应等方面发挥着重要作用。主要包括 LSEC、库弗细胞（KC）、肝星状细胞（HSC）以及淋巴细胞等。它们存在于肝血窦内，受到周边的血流剪切应力等微环境的影响，并且具有极其复杂的细胞-细胞相互作用。

1.1.3 肝脏体外模型的发展进程

在传统的二维（2D）培养中，分离的原代肝细胞通常被培养在培养皿中，很容易失去其分化结构和肝脏特异性功能^{[8][9]}。使用基质胶包覆的三维（3D）培养方式，可以使肝细胞显示出更强的肝功能，并保持其分化特征的时间更长^[10]。然而不管是 2D 还是 3D 体外模型，它们通常为静态培养，无法重现复杂的肝组织微环境，并且难以在体外维持较长时间的细胞活力（不超过 2-3 天）^{[11][12]}。在过去的十年里，更先进的体外微流控平台已经被开发出来（图 1.2）。它们主要分为三种类型，分别是填充床设计^[13]、中空纤维设计^[14]和平板设计^[15]。通过控制细胞-细胞和细胞-基质相互作用、剪应力和代谢产物等参数来概括细胞微环境^[16-18]，同时用于研究药物代谢和干细胞分化等复杂的生物过程。肝脏的体外模型构建依托这一平台得到了极大的发展^[19]，例如在类似活体的微环境下模拟肝脏生理，还原天然肝脏的复杂微尺度结构，以及提供一个快速、简单和高通量的过程^[20-22]。这种将肝细胞和微流控平台结合的 3D 动态模型，称为“肝器官芯片”。

理想的肝芯片是一个高通量系统，旨在体外重建肝脏动态物理化学微环境和特异性功能^{[23][24]}。目前的肝芯片在仿生方面的设计可以分为几种类型：一是在芯片微结构上尽量还原人体肝脏及组织的生理结构。例如在体外对肝脏的重要功能单位肝窦、肝小叶的模拟^[25]，通过设计不同的结构形状和通道尺寸在体外成比例的复刻肝脏结构；二是在细胞培养中加入多种类型的细胞来还原体内复杂的细胞构成，如在芯片中将 LSEC，KC，HSC 以及淋巴细胞等非实质细胞与肝细胞共培养^[26]，用于探究细胞-细胞和细胞-基质相互作用；三是在生理参数方面进行不同的模拟调节，如流体流动带来的剪切力、机械刺激和氧气浓度等，来模拟体内真实的生理微环境。

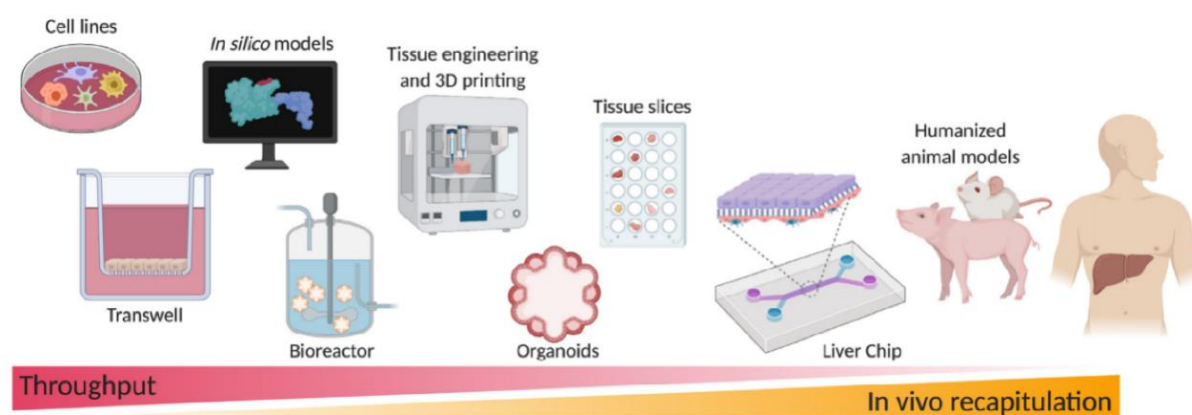


图 1.2 体外肝组织培养平台示意图

1.2 肝器官芯片的仿生研究现状

1.2.1 肝脏结构模拟：肝窦与肝小叶

肝窦是肝脏内重要的功能单位，由高度极化的微血管内皮细胞组成，其上有很多窗

口，是肝细胞同血管交换物质的主要通道。肝窦在脂质代谢、凝血、细胞生长分化、免疫和炎症反应中发挥重要作用，在体外还原肝窦的微结构对肝脏模型的研究至关重要。早在 2007 年，Lee 等人就创建了一种受生物启发的人工肝窦，堪称首批先进的肝脏微流控模型之一^[25]（图 1.3a）。该模型使用软光刻的方法进行构建，并培养了原代大鼠和人肝细胞。模型包括一个用于注入细胞的细胞室，一条用于流动培养基、营养物质和药物的流动通道。两者之间通过微柱间隙进行连接，该间隙可以防止培养基直接流向肝细胞，并允许营养物质和氧气通过扩散转移。但该模型只是在体外模拟了肝窦内皮屏障结构和流动物质的扩散，无法还原更复杂的肝脏微结构，比如窦间隙、氧气浓度、与非实质细胞的相互作用等。针对于此，Knut 等人整合了由人脐静脉内皮细胞（HUVECs）、巨噬细胞、星状细胞（LX-2）和肝细胞（HepaRG）共同培养的肝窦模型^[27]（图 1.3b）。该芯片具有类似于人类肝窦的形态特征，并以悬浮的、可自由灌流的膜作为细胞培养基质^[28]，来模拟窦间隙空间。同时在灌流通道的入口和出口处植入了氧传感器，以便在线测量细胞耗氧量。他们的研究表明，肝细胞在这种类似于人体肝窦的生理环境下表现出明显的分化和结构重组，并能在体外实现与原代人肝组织非常相似的极化，且功能稳定，并持续最少 4 天。

除去对于肝窦这种小型特定功能单元的复制，肝小叶作为肝脏的主要构件，存在大量的动态物理化学信号和微环境结构。为了更好地了解细胞和组织的结构特征和相互作用，对于肝小叶的体外模拟也尤为重要。Ho 等人基于经典的肝小叶基本形态，使用双电泳法设计了用于细胞构型的星状电极阵列，在芯片上重建了代表肝小叶的伪六角模型^[3]（图 1.3d）。在该模型中，HepG2 细胞和 HUVECs 细胞被电场有序引导、诱捕和排列，形成类肝小叶模式。同时细胞保持了 95% 的存活率，并且 CYP450 酶活性相较于单独培养的 HepG2 细胞提高了 80%。另一种设计是 Ban 等人建立的超大规模肝小叶芯片（图 1.3c），该模型是一个由肝小叶状的六角形组织培养室组成的综合网络，用于培养 HepG2 细胞和 hiPSC 来源的肝细胞^[29]。芯片的每个腔室都有一个模拟肝小叶中央静脉的中心出口，并且在培养室和通道之间构建了隔离室壁来保护细胞免受对流的剪切力的影响，同时以扩散的形式传输营养物质。该模型在生理尺度上模拟了肝小叶、肝窦和门静脉结构，并观察到稳定的白蛋白分泌、尿素合成以及胆小管网络的形成。未来该平台可更好的应用于共培养和药物诱导的肝毒性研究。

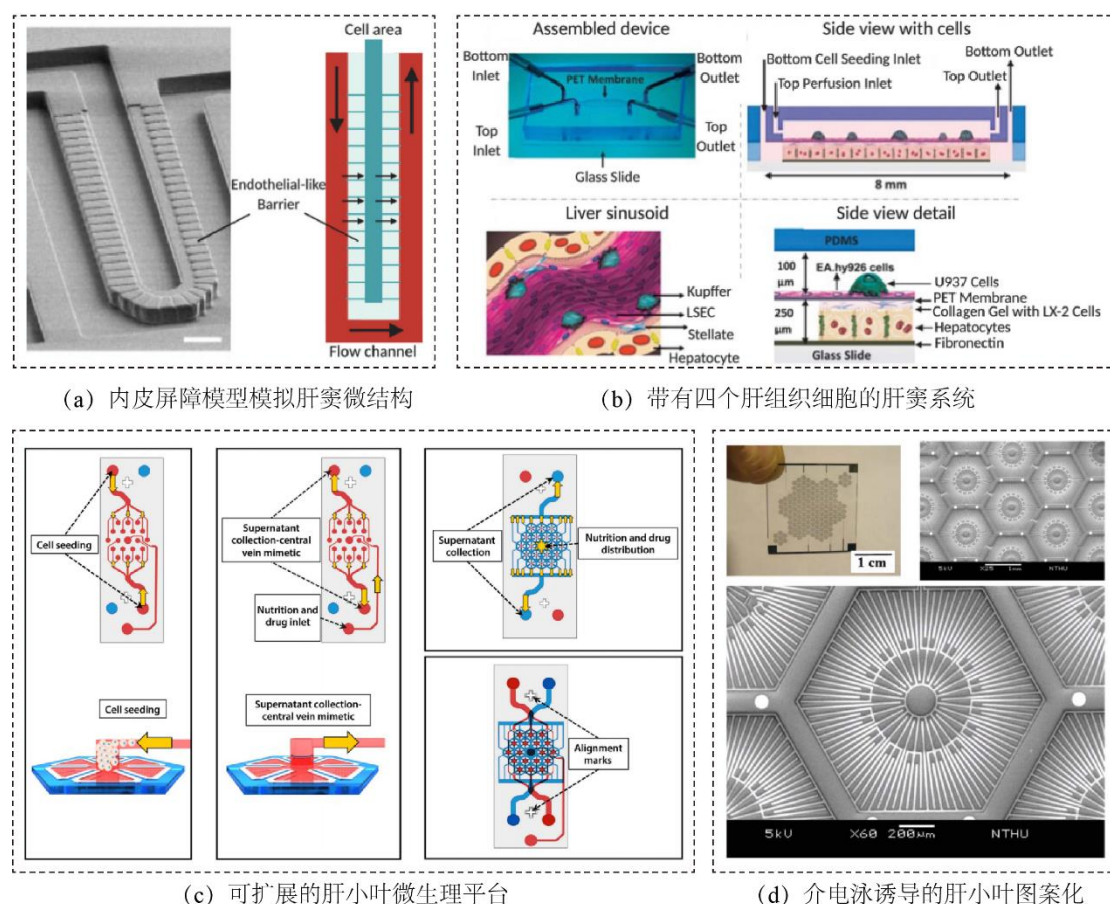


图 1.3 仿生肝窦和肝小叶器官芯片

1.2.2 肝脏细胞模拟：多细胞共培养

体外对于肝窦和肝小叶模型的构建灵感来自于它们在体内的形态结构，虽然这两种模型能够模拟内皮层的扩散通道，保护肝细胞免受流体的直接剪切应力，但是这些非生物内皮样屏障不能重现体内的细胞间相互作用。根据肝脏生理学，非实质细胞群在支持肝细胞功能和干扰炎症等方面起着重要作用^[30]，例如库弗细胞能够清除衰老的红细胞、细菌以及各种内源性毒素^[31]，星状细胞可以储存维生素 A 并控制血窦灌注^[32]，肝窦内皮细胞通过分泌细胞生长因子（HGF）和白细胞介素-6 在保护肝细胞免受毒性损伤方面起着重要作用^[33]。

体内器官的复杂性很难在体外模拟，在体外操纵细胞间的相互作用更是一个很大的挑战^{[34][35]}。Steven 等人建立了一种简易的微流控双层装置，该装置可以在静态培养基中以简单的单一培养形式维持原代人类的肝细胞表型^[36]。在实验中他们引入了原代人肝细胞和人肝窦内皮细胞，经过一段时间的共同培养之后，肝细胞呈现立方结构，并形成胆汁网络，表明肝细胞可以维持良好的功能。该设备结构较为灵活，可以引入其他类型的非实质细胞以实现共培养效果，是体外探究细胞-细胞相互作用的初步模型。但该模型缺少动态的生理环境，无法在体外对肝脏微环境很好的模拟。

在 Prodanov 等人的一项研究中，原代人肝细胞与内皮细胞（EA.hy926）、星状细胞（LX-2）和库弗细胞（U937）共同培养在微流控芯片中^[37]。该芯片由两个微流体室组成，并用多孔膜隔开。芯片内的细胞按照人体内的肝脏微环境进行接种，其中内皮细胞和库弗细胞接种在膜上方，星状细胞与胶原溶液混合置于膜下方来模拟窦间隙，肝细胞接种于下层底部。在培养过程中，多孔膜来模拟肝窦的开窗结构以保护肝细胞避免直接受到介质流的影响，同时对培养液和氧气进行扩散，类似于活体肝窦。经过证实，重组肝窦微结构的体外模型可以成功地维持细胞活性 28 天。此外，与静态培养相比，流动培养下的白蛋白合成和尿素代谢更高，但 CYP450 的表达无太大变化。而 Du 等人设计的芯片也采用了类似的上下层结构和四细胞共培养的方式^[26]，与之前不同的是，他们通过流体力学数值模拟和颗粒跟踪可视化实验，对肝芯片内的流场进行了定量分析。探究了存在细胞-细胞相互作用的前提下介质流产生的剪切力对细胞造成的影响（图 1.4a）。结果除了发现较静态培养时的白蛋白和尿素分泌增多外，还发现剪切流单独促进了生长因子的产生和 CYP450 的代谢。

最近 Deng 等人建立了一种更为复杂的基于 PDMS 多孔膜夹层的灌注系统^[38]。该系统由上中下三个微流体室构成，按生理分布的顺序排列种植了四种人源细胞（HepG2、LX2、EAhy926 和 U937 细胞），同时引入人工肝血流和胆汁流来模拟肝窦复杂的介质流环境（图 1.4b）。测定了对乙酰氨基酚的肝毒性，并计算了使用辅助药物时对乙酰氨基酚的肝毒性变化。结果证实该装置保持了良好的合成和分泌功能，以及细胞色素 P450 酶的活性。同时获得了比原代肝细胞平板模型更准确的肝毒性检测。

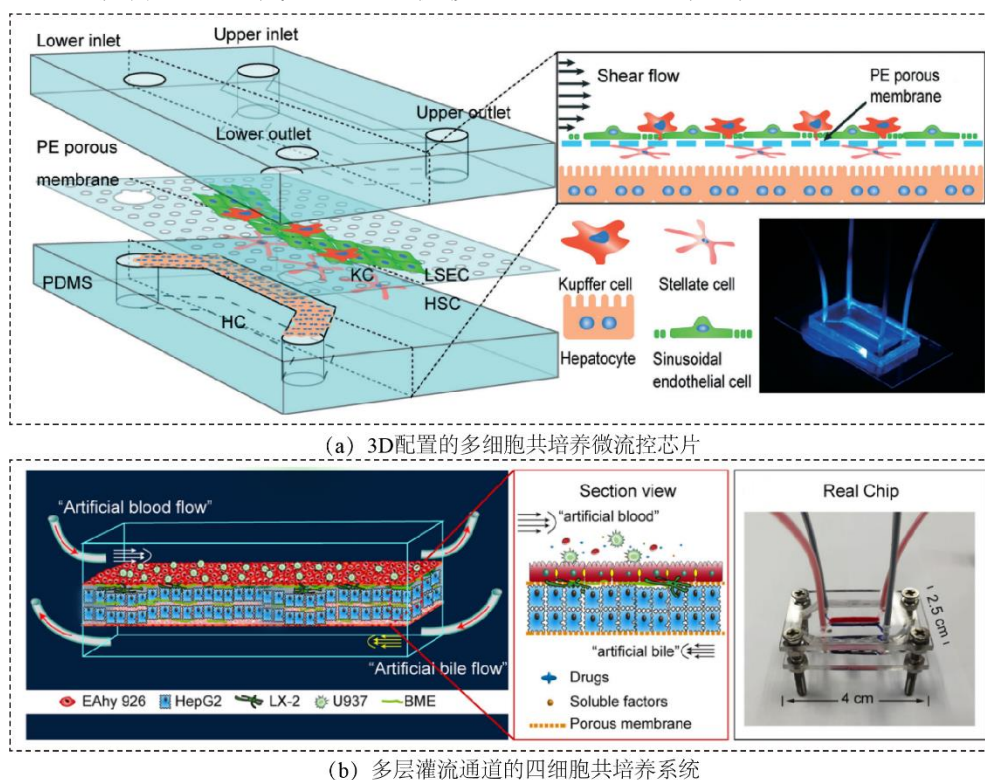


图 1.4 多细胞共培养器官芯片结构示意图

1.2.3 肝脏物理化学参数模拟：氧气和剪切应力

除了探究组织结构和细胞-细胞之间的相互作用外，各项动态生理参数对于体外肝细胞模型的构建也至关重要。例如，氧是肝脏微环境的重要组成部分，对细胞代谢、分化和生长起着重要作用^{[15][39]}。在体内，肝脏除了门静脉循环供氧外，还与高氧动脉循环相连，以保持充足的氧气供应^[40]。此外，沿着肝窦从门静脉到中央静脉这段区域存在着氧气浓度梯度^[41]，肝细胞的基因表达和新陈代谢会受到不同氧气梯度的影响，这也是肝功能分区的原因之一。

现有的体外静态培养通过空气-液面的扩散获得氧气，而动态培养则是从灌注的介质流中获取氧气来源。Kang 等人建立了一种可以产生一系列氧浓度的体外微流控平台^{[42][43]}（图 1.5a）。该平台能够在单个连续的微组织上主动产生一系列的氧气浓度，范围从常氧到严重缺氧。他们将原代大鼠肝细胞暴露在 0.3%-6.9%的氧气梯度中。结果发现，随着缺氧程度的增加，肝细胞活力下降约 80%。证实了当暴露在不同氧气梯度中时，肝细胞会产生不同的代谢和遗传反应。这种氧梯度芯片平台可以进一步扩展到肿瘤等其他缺氧组织的研究，以及处于有限氧气条件下的药物毒性和疗效的研究。tonon 等人设计了一种用于产生稳定氧梯度的微流控装置，该装置由玻璃和聚二甲基硅氧烷（PDMS）制成，并用钌化合物溶液的荧光来探测氧气的空间浓度^[41]。通过对人类胚胎干细胞（HESCs）分化为肝细胞过程的模拟，在体外重建了功能性的肝代谢分区，这与在人体内肝小叶的结果一致（图 1.5b）。

除了氧气的影响之外，剪切应力也是体外设计灌注类肝芯片必须要考虑的生理参数。芯片通道中剪切应力是由流体的粘性产生的，它的变化与介质流的流速和介质粘度存在密切关系。根据 Tilles 等人的研究，当细胞暴露的剪切应力超过 5 dyn/cm^2 (0.5 Pa) 时，肝细胞功能将显著降低^[15]。而 Tanaka 等人^[44]的实验结果也表明低剪切应力的流动条件会产生更高的白蛋白合成速率。这就产生了一些问题，为了避免产生较大的剪切应力以损伤细胞，需要相对较低的灌注率，然而较低的灌注率培养基的携氧能力又相对较低，无法满足细胞的氧气供应。因此对于介质流的剪切力与氧含量的平衡尤为重要。现有解决办法一般是选取较小的介质流，采用增加芯片氧气浓度^[45]或者限制肝细胞密度^[46]以保证氧气的充足供应。除此之外，也可以在芯片设计中加入多孔膜或扩散通道以隔绝介质流来保护细胞免受剪切力的影响^[47]。

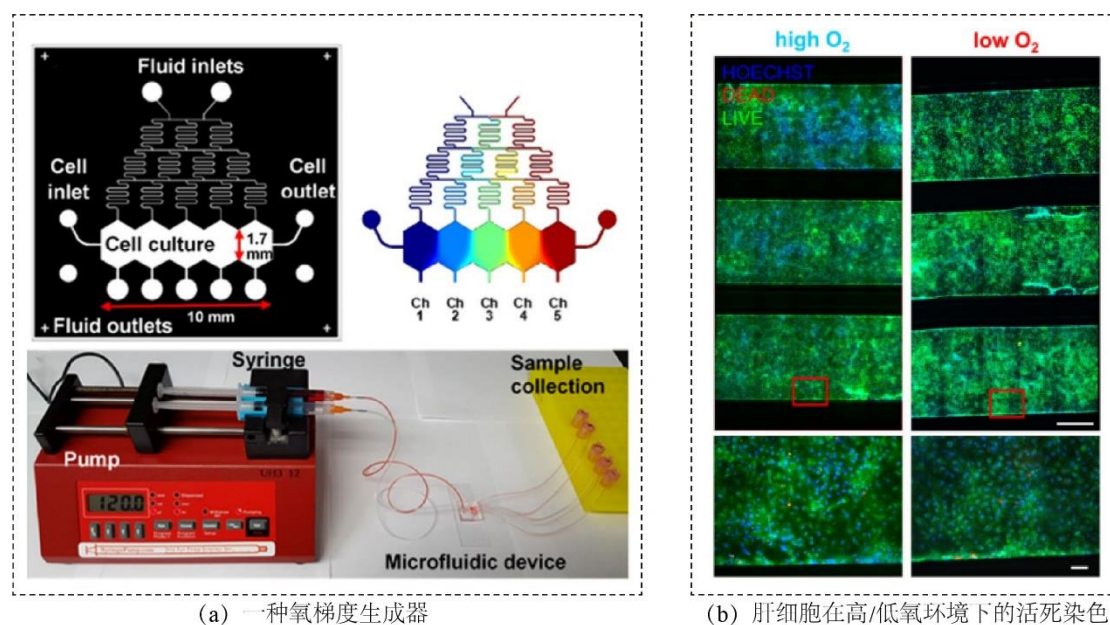


图 1.5 肝器官芯片内氧梯度的构建以及细胞生长状态

1.3 肝器官芯片的应用

肝脏是人体代谢的主要场所，在药物代谢中起着重要作用（图 1.6）。迄今为止，肝器官芯片已广泛用于药物筛选和药物研究中的毒性试验。Kostadinova 等人建立了体外 3D 肝脏培养系统来预测肝毒性，将原代肝实质细胞和非实质细胞接种在 3D 支架上，并对其进行了表征^[48]。培养系统保持细胞色素 P450 的活性，形成胆小管样结构，并对炎症刺激做出反应。他们发现与单层肝细胞培养相比，3D 共培养模型能更好地检测体内药物诱导的毒性，包括物种特异性的药物反应。此外，一些药物仅在慢性暴露时才显示出临界毒性水平，为了评估药物对肝脏的慢性影响，体外肝芯片模型要具有长期培养的能力。Messner 等人设计了一种由原代人肝细胞和非实质细胞组成的 3D 肝脏模型，并将其用于长期测试炎症介导的肝毒性^[49]。该模型可以让肝微组织保持稳定的活性和功能长达 5 周，实现了对药物慢性效应的评估。Verneti 等人建立了著名的 SQL-SAL 系统，该系统在连续介质灌流下维持细胞活性长达 28 天。细胞表现出稳定的代谢活动，对各种有毒化合物有较强的反应性^[50]。通过此系统，证实了急性和慢性肝损伤以及纤维化损伤的早期迹象。这种新一代的毒性测试系统预计将改善对人类风险和药物疗效的预测，有望减少并最终取代动物试验。

肝脏疾病是导致患者死亡的首要原因之一，并且在环境因素的影响下成为一个越来越严重的问题，迫切需要开发先进的临床前模型来研究肝脏疾病的机制^[51]。比较典型的肝脏疾病是非酒精性脂肪性肝病（NAFLD），它是全世界最常见的慢性肝病，在发达国家发病率尤其高^[52]。从单纯性脂肪变性可发展为非酒精性脂肪性肝炎，肝硬化，最终导致肝细胞癌（HCC）。HCC 是全球三大死亡原因之一，因此需要将 NAFLD 作为潜在风

险因素进行早期诊断^[53]。针对此情况，Manuele 等人建立了 3D 微流控的 NAFLD 模型^[54]，将棕榈酸和油酸作为游离脂肪酸引入肝脏芯片中，评估由于 FFA 过载而导致的细胞内脂质积累、细胞毒性和氧化应激。与 2D 静态培养相比，该芯片能够在微流控动态培养中逐渐降低细胞内脂质积累，提高肝细胞存活率，并将氧化应激反应降至最低，从而更接近于体内观察到的慢性脂肪变性。该芯片为研究 NAFLD 的发病机制提供了一个更可靠的平台。此外，酒精性肝病（ALDS）^[55]、乙型肝炎病毒（HBV）^[56]以及 HCC^[57]等疾病模型已经陆续创建出来，这些模型对于研究肝病进展、促进药物发现和进行毒性测试具有很大的价值。

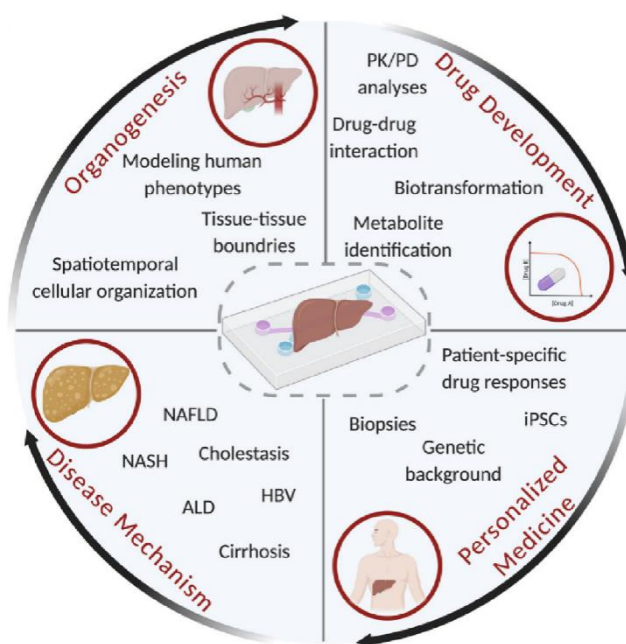


图 1.6 肝器官芯片的应用

1.4 基于肝器官芯片的多器官芯片

人体内器官相互作用的典型例子之一是首次新陈代谢^[58]。药物在肠道和肝脏经历了复杂的吸收和新陈代谢过程，其中输运和反应在各个位置同时发生。但在目前单一细胞培养的体外模型中，难以将首过代谢进行模拟复制。为了解决这个问题，Midwoud 等人开发了一种基于微流体的系统，用于新陈代谢研究^[59]。该系统可以在具有连续介质流动的两个腔室中顺序地灌流肠道和肝脏组织切片。结果证实在该系统中，肠道和肝脏切片的活体代谢率分别保持了至少 8 小时和 24 小时，表达了它在肠道和肝脏切片孵育的代谢研究中的适用性。而 chen 等人设计了一种用于复制首过代谢的新型肠-肝芯片^[60]。芯片由肠上皮细胞（Caco-2）和肝癌细胞（HepG2）两个相邻的独立层组成。药物从肠腔进入肝腔，以重现吸收和代谢的过程。在共培养时，注意到两种细胞类型的生理功能变化。两种细胞的细胞色素 P450 代谢活性均显著增强，Caco-2 细胞的吸收特性也随着流

量的存在而改变。两种类型细胞行为的显著改变证实了发展多器官共培养系统的必要性。后续他们成功模拟了脂肪酸通过肠层吸收，随后在肝细胞内沉积的过程^[61]。

Wen 等人开发了一个新的流体平台，可以互连多个微生理系统，允许在多种生理系统中进行药代动力学研究^[62]（图 1.7a）。通过对肠-肝细胞共培养的研究，他们发现器官之间的沟通可以促进肝脏代谢的上调。此外，他们研究了正常和炎症环境下的肠-肝组织相互作用^[63]。发现肠-肝相互作用中的炎症反应会加剧组织特异性功能的负面影响，证实了多组织平台对理解复杂的病理生理过程的帮助。Bricks 等人使用另一种生物学模型来模拟肠道和肝脏之间的相互作用^[64]。他们对肠道细胞（Caco-2 TC7）和肝脏细胞（HepG2 C3A）动态共培养，并用生物反应器跟踪非那西丁的代谢情况。结果发现其可以通过 Caco-2 TC7 细胞的转运，被 HepG2 C3A 细胞的 CYP1A2 酶代谢成扑热息痛。与在静态培养皿中的共培养模型相比，他们提出的生物反应器表现出更高的代谢性能。除此之外，肠-肝关系的其他模型也已经开发出来，用于探究纳米颗粒造成的损伤^[65]和 PM2.5 的毒性效应^[66]（图 1.7b）等等。这些方法集成了多细胞组织结构和定量机制建模，在临床前药物开发中具有强大的作用。

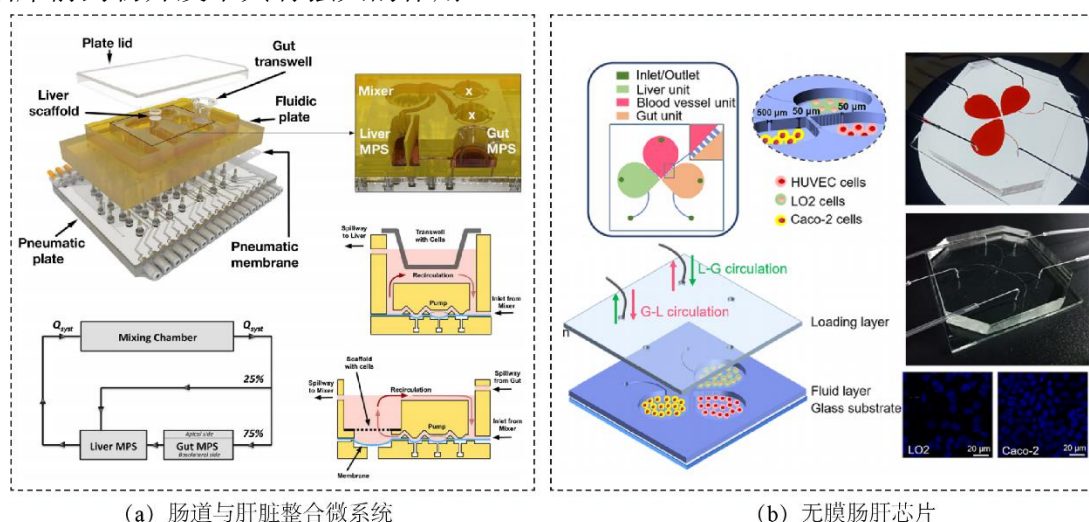


图 1.7 肠-肝多器官芯片结构示意图

1.5 挑战和未来方向

虽然在肝器官芯片体外模拟方面已经开展了大量的工作，但该领域仍面临着许多挑战。必须投入资源设计和开发来克服这些挑战，以提高这些设备在工业和临床环境中的实用性和实施效果。

目前 PDMS 是器官芯片应用最广泛的材料，因为它提供了一种生物惰性，且价格低廉，透明性好^[67]。然而，这种聚合物显示出一些关键的缺点，例如它倾向于吸附疏水性小分子^[68]，导致亲脂化合物吸附到器件的壁上^[69]。并且一些与细胞一起孵育的药物或荧光标记可以扩散到 PDMS 设备中，降低了溶液中溶质分子浓度的再现性^[70]。因此，用一

些替代聚合物（如聚氨酯、苯乙烯嵌段共聚物^[71]）或基于 ECM 材料^[72]的表面改性可以解决这些缺点。在细胞选择方面，许多研究选用了永生化细胞系，但已证明其与体内发现的人类细胞生物学相关性较差^[73]。将患者特定的肝脏器官、球体或 iPSCs 和局部免疫细胞整合到肝脏芯片中，有助于创建更贴近在体微环境的平台。然而，这些细胞在操作难度上较为复杂，且成本昂贵。

此外，肝脏和肠道的体外多器官模型也存在着许多问题。例如，肠上皮和肝实质细胞的生长速率不同，在进行生物缩放时要考虑其缩放比例，并且对于不同的通道结构还应控制不同的流速以适应细胞生长环境^[74]。此外，每个组织都需要配备与该组织相关的特定营养素和生长因子^[75]，因此提供这种通用细胞培养基也是一个关键挑战。目前关于肝器官芯片的大部分工作都是在学术实验室进行的。设备之间存在巨大差异，模型的结果和数据也因实验室而异，缺乏标准化的通用设计和规则，并且制造和实验实施的成本相对昂贵，不利于器官芯片的广泛使用。同时，在几乎所有的芯片模型都使用各种泵来进行液体灌流，这也大大增加了装置的体积，并限制了其并行能力（低吞吐量）。

1.6 课题研究意义与主要内容

器官芯片微生理系统(MPS)已经成为一个强大的平台，可以模拟特定的人体组织、器官，甚至多个器官的相互作用。它被广泛用于体外临床前研究、药物开发以及环境毒理学^[76-78]。由于肝脏在代谢、特异性疾病和药物毒性中的核心作用，肝脏 MPS 的发展引起了特别的关注，特别是肝小叶^[79,80]。肝小叶是肝脏的基本结构和功能单位，血液从门静脉通过窦状毛细血管网络流入中央静脉。在这个过程中，血液中的氧气通过扩散和交换逐渐被消耗，形成氧气梯度^[81]。这种氧气梯度与形态发生场共同形成了一个高度可变的微环境。随着这种空间变异性，关键的肝功能在小叶之间表达不均匀，这种现象被称为分区^{[81][82]}。体外施加合适的氧梯度对于构建肝分区模型，以及理解肝脏细胞异质性功能、疾病表型和毒性损伤方面尤为重要。

微系统内常见的氧梯度构建方式有很多，例如药物抑制、化学反应和气体灌注等。其中，通过细胞呼吸耗氧的方式凭借较高的时空精确度是一个不错的解决方案。轴向的氧气梯度沿着流体流动方向产生^[83]。然而，这种方法易于忽略细胞原位产生的标志物对细胞间通讯的影响（例如蛋白表达、细胞因子释放），因为流体的快速流动使得细胞不能维持恒定的环境。流体产生剪切应力也会进一步影响细胞的功能（例如白蛋白合成、CYP450 活性等）。目前的微系统无法很好地构建出肝分区所需的氧浓度梯度，导致其结构和功能与实际肝脏存在很大差异。因此，本文将围绕基于环境氧对流扩散模型的肝分区芯片研制及应用展开研究，主要研究内容如下：

（1）具有生理氧浓度梯度的肝分区芯片构建。首先介绍肝分区芯片的设计灵感、原理以及加工方案，以及整个灌流系统的搭建。随后通过环境氧对流扩散的数值模型，在

肝分区芯片内构建贴近人体肝小叶的氧浓度梯度环境，并对该氧梯度环境下对应的流体剪切应力和营养物质扩散情况进行分析。最后在芯片内培养肝实质细胞，研究细胞在生理氧浓度梯度下的生长状态，包括肝分区形貌的还原情况以及异质性功能的实现。

（2）基于肝分区芯片的非酒精性脂肪肝病（NAFLD）建模以及干预机制探究。首先，探究构建 NAFLD 所需的合适游离脂肪酸（FFAs）浓度和诱导时间。观察在生理氧梯度环境下，细胞在疾病状态下的形貌改变和功能影响。随后，在芯片中集成谷丙转氨酶（ALT）传感器动态监测 NAFLD 诱导的细胞损伤。在氧浓度梯度区间改变的情况下，通过关键蛋白的表达，探究氧浓度梯度对于 NAFLD 的干预机制。

（3）与肠器官芯片结合制备肠-肝多器官芯片，探究微塑料（MPs）的转运、吸收和损伤。首先，介绍仿生肠-肝器官芯片的设计和制备。通过有限元分析确定构建生理剪切应力所需的灌流速度。通过施加循环气压形成拉伸应变，模拟生理肠道蠕动。随后在培养液中添加 100nm 的 MPs，探究其在肠道中的转运和肝脏中的损伤。最后，通过改变拉伸应变探究肠道蠕动对于 MPs 转运的潜在影响。

第2章 肝分区芯片的设计制备及仿真分析

2.1 引言

肝脏分区是由于血液流动过程中细胞呼吸对氧气的消耗引起的。这导致沿径向氧气浓度逐渐降低,形成氧气浓度梯度^[84]。然而,氧浓度梯度对细胞功能和细胞间通讯的直接影响,目前还知之甚少。体外研究对于阐明细胞微环境中氧气和其他物理参量对分子、细胞和组织表型的影响至关重要,因为它良好的可控性。传统的体外调节氧气张力方法主要包括使用低氧舱或工作站,将培养的细胞暴露在均匀的缺氧水平下。体外研究表明,在不同的缺氧持续时间范围内,均匀的缺氧对肝细胞产生不同的影响。例如,持续10小时的缺氧导致白蛋白合成功能下降至27%^[85]。当缺氧时间延长至18小时,脂肪酸 β 氧化受损,同时脂质储存能力增加^[86]。在24至72小时后,缺氧也会耗尽谷胱甘肽(GSH)储存,导致线粒体内的活性氧(ROS)升高,最终引发细胞凋亡^[87]。然而,由传统器件构建的均匀缺氧微环境,HepaRG细胞在48小时范围内CYP4A3的表达明显下调^[88],这与体内研究的结果不一致^[89,90]。

传统的均匀低氧工具无法再现肝小叶特有的空间非均匀氧气特征,因此无法揭示氧梯度对于细胞的影响。微工程技术,包括肝器官芯片和生物传感器,已广泛应用于构建体外系统,深入研究缺氧梯度下的肝小叶脂肪变性和损伤^[91-93]。其中一个模型通过使用不同浓度的FCCP(carbonyl cyanide p-trifluoromethoxy-phenylhydrazone)解偶联线粒体氧化磷酸化,模拟了缺氧梯度^[94]。但这是通过药物而非物理上的氧气张力来生成的,难以对缺氧进行量化。肝器官芯片模型通过灌注气体混合物在物理层面上实现了氧气梯度的重建。不同比例的氧气和氮气通过被动扩散的方式在芯片中形成缺氧梯度^[41]。然而,该方法未考虑细胞自身耗氧,并且与生理上氧浓度梯度(3.9%-8.5%)^[95]不匹配,且在时空控制上存在较低的精确度。类似地,通过在培养液中灌注不同比例的亚硫酸盐也可以构建氧气梯度^[96]。亚硫酸盐在水中发生还原反应,将氧气还原成水,降低水中的溶解氧以构建缺氧环境。但是亚硫酸盐可以诱导肝细胞中的氧化应激反应,导致肝细胞中ROS的形成和脂质过氧化^[97]。因此,在理解氧气依赖性的肝分区功能和细胞通信方面受到技术限制。这些限制包括如何构建一个集成系统,并在其中实现缺氧的定量化和精确控制氧梯度的范围。

本章节中设计了一种具有生理氧浓度梯度的肝分区芯片,用于克服这些局限性。它具有两个关键特征:(I) 芯片仿生了肝窦窗孔渗透效应导致的血液流动特征,它的双层几何结构贴近在体肝小叶六边形。(II) 基于环境氧对流扩散的数值模型,调整溶解氧的扩散速率,结合细胞有氧呼吸速率,形成培养环境中可控而稳定的氧气梯度。这些特征

既能保证流场穿过多孔膜在下层产生氧浓度梯度，又能使剪切应力敏感的肝细胞免受流动摩擦。

2.2 实验部分

2.2.1 制备肝分区芯片的实验材料和设备

制备肝分区芯片所使用的材料和设备如下表所示：

表 2.1 制备肝分区芯片所使用的实验材料

材料名称	生产厂家	型号
聚二甲基硅氧烷（PDMS）	美国道康宁	184
聚偏二氯乙烯（PVDC）	日本旭包鲜	-
聚碳酸酯滤膜（PCTE）	北京赛福莱博科技有限公司	47-0.2-10
无水乙醇	烟台远东精细化工	64-17-5
单分散荧光微球	上海阿拉丁	M122073
三（4,7-二苯基-1,10-菲罗啉）二氯化钕（II）配合物	上海麦克林	T819411
葡萄糖溶液	上海麦克林	G766696
葡萄糖氧化酶	上海麦克林	G810485

表 2.2 制备肝分区芯片的实验设备

实验设备名称	生产厂家	型号
氧等离子清洗机	郑州成越科技	CY-P2L-B
细胞培养箱	山东博科生物	QP-160
生物安全柜	山东博科生物	BSC-1100 II A2-x
恒温干燥箱	绍兴易诚仪器	101-00B
倒置显微镜	日本尼康	TS2R
共聚焦免疫荧光显微镜	德国蔡司	LSM880
扫描电子显微镜	日本日立	Regulus8220
高速相机	合肥中科君达	Revealer G270
注射泵	保定迪创电子	LSP-02-1B
蠕动泵	保定迪创电子	BT100LC/DG6
立式蒸汽灭菌器	江苏登冠医疗	DGL-35B

2.2.2 肝分区芯片的制造

肝分区芯片由聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 制造。该芯片由四部分组成: 带有微通道的顶部 (宽 1.0mm×高 0.5mm×6 条), 带有六边形培养腔的底部 (边长 6mm×高 0.5mm), 中间多孔膜 (厚 10 μm; 孔径 1 μm) 和包覆的聚偏二氯乙烯 (PVDC) 薄膜 (厚 12 μm)。多孔膜将顶部和底部分开, 在构建组织界面方面发挥作用。PVDC 薄膜用于隔绝外部氧气环境, 以便构建氧气梯度^[102]。首先, 将 PDMS 的基础弹性体和固化剂以 10: 1 的重量比混合。脱气 30 分钟后, 将 PDMS 以微通道图案倒入模具中。在 70 °C 固化 4 h 后制成带有微通道的顶部和底部。在顶部打孔以便输送细胞培养基。然后, 将顶部、多孔膜和底部通过氧等离子体键合 120 s, 贴合后涂敷两层 PVDC 薄膜。最后, 使用不锈钢细管 (内径 0.8 mm; 外径 1.0 mm) 将芯片中的微通道与硅胶毛细管 (内径 1.0 mm; 外径 1.5 mm) 连接起来 (图 2.1)。使用高精度蠕动泵和注射泵控制流动。

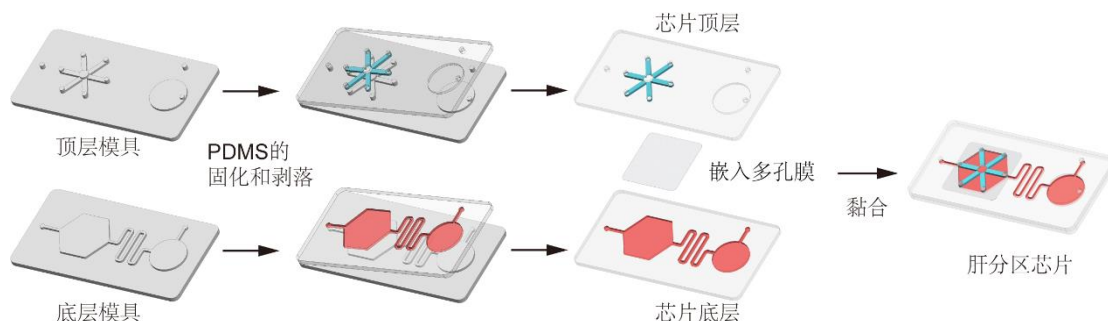


图 2.1 肝分区芯片的制作流程图

2.2.3 肝分区芯片内的流体流动计算模拟

将该芯片结构的三维 (3D) 文件导入 COMSOL (Multiphysics 5.5, 试用版) 中, 随后在培养层上构建 20 μm 高度的六棱柱模拟 HepaRG 单层。使用“多孔介质的层流”模块进行模拟。灌注层和培养层都设置为流体域, 芯片材料使用 PDMS。选择牛顿不可压缩层流, 无滑移沟道壁的边界条件。装置出口压力设为 0 Pa。“精细”的物理控制网格。

使用多孔介质对多孔膜进行建模。从下面的公式 (2.1) 获得孔隙率 ε ^[26]:

$$\varepsilon = \frac{\pi d^2 \rho}{4} \quad (2.1)$$

d 是孔径, ρ 是孔密度, 渗透率 α 可以由以下公式求出 (2.2):

$$\alpha = \frac{D_p^2}{150} \frac{\varepsilon^3}{(1 - \varepsilon)^2} \quad (2.2)$$

D_p 是多孔膜的平均孔径。Navier-Stokes 方程 (2.3) 用于模拟层流条件下的流体行为:

$$\rho \left(\frac{\delta u}{\delta t} + u \nabla u \right) = -\nabla p + \eta \nabla^2 u + f \quad (2.3)$$

u 是流速, p 是压力, ρ 和 η 分别为 37 °C 下流体的密度 (0.9933 g cm⁻³) 与动态粘度 (0.692 × 10⁻³ Pa S)。

2.2.4 肝分区芯片内的物质扩散（氧气、葡萄糖）计算模拟

对于 3D 稳态氧分布和葡萄糖的扩散，我们使用“层流和稀物质传递耦合”模块在与时间相关的条件下进行模拟。在肝分区芯片中，氧气的唯一来源是培养基的流入。其中假设细胞层的氧气消耗量遵循 Michaelis-Menten 动力学（2.4），根据实验测定芯片中 HepaRG 的平均种植数量，结合文献设置肝细胞的耗氧量（OCR）^[30]。Michaelis-Menten 方程如下：

$$R_{O_2} = \frac{V_{max}C_{O_2}}{K_m + C_{O_2}}\rho_{cell} \quad (2.4)$$

V_{max} 和 K_m 参考表 2.3 中列出的仿真参数， ρ_{cell} 是细胞密度。通过添加透氧系数来模拟在芯片外部涂覆 PVDC 膜的效果。在 37°C 和 18.2% 的环境含氧量下的细胞培养箱中进行模拟。假设扩散受到标准稳态对流-扩散方程控制（2.5）

$\left(\frac{\partial c}{\partial t} = 0\right)$:

$$\nabla \cdot (-D\nabla c) = R - \nabla \cdot (uc) \quad (2.5)$$

其中， c 是物质浓度（mol/m³）； D 是扩散系数（m²/s）； R 是反应速率（mol/m³/s）； u 是速度（m/s）。流体流动和物质扩散模拟所用的详细参数如下表所示，其中多孔膜的孔隙率、渗透率根据所购买产品的实际孔径和孔密度计算得出，葡萄糖的初始浓度根据产品说明得出，其余均为文献引用：

表 2.3 肝分区芯片的内部仿真参数

参数	介绍	数值	单位	来源
V_{max}	肝细胞耗氧量	6	nmol/min/ 10 ⁶ cells	文献 ^[30]
K_m	米切利斯常数（耗氧量）	3.5	mmHg	文献 ^[30]
D_m	氧气在培养基中的扩散系数	3×10 ⁻⁹	m ² /s	文献 ^[98]
P_{PDMS}	氧气在 PDMS 中的渗透系数	5.8×10 ⁻¹⁰	cm ³ (STP)·cm/ cm ² ·s·Pa	文献 ^[99]
CO_2	培养基中的饱和氧气含量	18	%	文献 ^[100]
P_{PVDC}	氧气在 PVDC 中的渗透系数	1×10 ⁻¹⁶	cm ³ (STP)·cm/ cm ² ·s·Pa	文献 ^[101]
ε	多孔膜的孔隙率	0.157	N/A	计算得出

续表 2.3 肝分区芯片的内部仿真参数

α	多孔膜的渗透率	3.6×10^{-13}	cm^2	计算得出
C_{glu}	葡萄糖初始浓度	5.5	mol/m^3	产品说明
D_{glu}	葡萄糖在培养基中的扩散系数	9×10^{-10}	m^2/s	文献 ^[29]

2.2.5 肝分区芯片内的氧梯度验证

使用三(4,7-二苯基-1,10-菲罗啉)二氯化钌(II)配合物(Ru(ddd))验证培养层的氧气分布。使用 5ml DMEM 细胞培养基配置 100mM Ru(ddd)溶液。随后置于培养箱中,在芯片中以 60 $\mu\text{L/h}$ 的流速循环灌流 2h。Ru(ddd)溶液的荧光在氧气存在下被淬灭。使用共聚焦免疫荧光显微镜拍摄培养层荧光分布,通过求解 Stern-Volmer 方程(2.6),以确定氧气在培养层的百分比分布^[41]:

$$\frac{I_0}{I} - 1 = K_q[Q] \quad (2.6)$$

式中, I_0 是 Ru(ddd) 探针在贫氧(0%)和待测氧中的荧光强度, K_q 是氧气分子与荧光染料发生猝灭反应的速率, $[Q]$ 是待测溶液中氧的浓度。荧光强度与氧浓度校准是通过 0% 和 18% 氧含量的培养基进行的。其中 0% 氧含量的培养基是通过添加 5 U/mL 葡萄糖氧化酶生成的。

2.2.6 肝分区芯片内的粒子图像测速

为了探究芯片中实际的流场情况,与仿真实验相互验证,使用带有绿色荧光标记(488/518)的聚苯乙烯微球(直径 1 μm)测量流速。用超纯水将微球稀释至 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的浓度,向培养层注入 50 μL 荧光颗粒溶液后堵住进出口。随后使用注射泵将溶液以 60 $\mu\text{L/h}$ (3.7%-8.9%氧梯度)的速度持续注入灌流通道。在此过程中使用高速相机对芯片内的荧光颗粒进行拍摄(1000fps, 10x),并导入配套的软件逐帧分析计算荧光颗粒的流场分布。根据流体力学牛顿内摩擦定律得到的公式(2.7),对细胞受到的流体剪切应力进行计算。

$$\tau = \frac{6\mu Q}{H^2 W} \quad (2.7)$$

其中 τ 是流体剪切应力 (dyne/cm^2), μ 是动态粘度 ($\text{g/cm} \cdot \text{s}$), Q 为灌注流量 (cm^3/s), W 是通道宽 (cm), h 为通道的高度 (cm)。

2.2.7 肝分区芯片内的养分扩散实验

为了探究实际的营养物质(例如葡萄糖)的扩散情况,水溶性红色染料被加入到 5.5mol/m^3 的葡萄糖溶液中,将葡萄糖的扩散过程可视化。在芯片培养层注入 PBS 并封

住进出口，5ml 标记溶液以 60 $\mu\text{L/h}$ 循环灌流。视频记录扩散过程直到葡萄糖在培养层扩散完全。

2.3 结果与讨论

2.3.1 肝分区芯片的设计灵感及结构功能

为了将肝细胞暴露在类似于肝小叶生理氧浓度梯度^[81]中，我们受细胞自主耗氧^[84]和肝窦渗透作用^[5]的启发，设计了一个肝分区芯片（图 2.2a）。含氧介质（蓝色）模拟肝小叶血流方向，从芯片六角顶点流入，向中心汇聚并流出。灌流层和培养层（红色）通过模拟肝窦渗透效应进行物质交换。图 2.2b 显示具有氧梯度（色标）的 1/6 双层肝分区芯片区域（区域 A）的俯视图和单个通道剖面图（区域 B-B'）示意图。模拟显示含氧培养液的扩散方向和流场的流动轨迹。

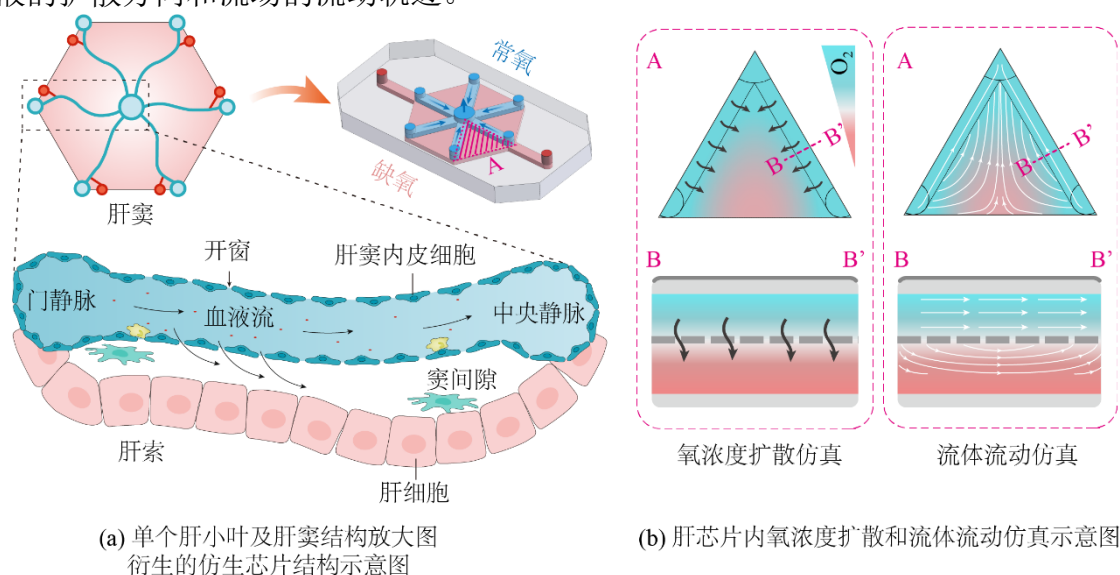


图 2.2 肝分区芯片的设计灵感

芯片整体由四层结构组成（图 2.3a）：包括，隔氧层、灌流层、培养层和电极层。隔氧层由 PVDC 薄膜构建，用于隔绝外界氧气^[102]。灌流层和培养层由 PDMS 组成，用于含氧培养液灌流和细胞培养。其中含氧培养液由六个蓝色通道顶点注入汇聚在中间通道流出，用来模拟血流从门静脉（PV）向中央静脉（CV）的汇聚^[103]。细胞的种植在边长 6 mm 的红色六边形区域进行，用来贴近在体肝小叶的几何结构^[104]。一层多孔聚碳酸酯（PC）膜（孔径为 1 μm ）被粘接在两层中间，可以模拟肝窦窗孔的渗透效应，允许氧气分子和营养物质扩散。电极层为真空溅射的 200 nm 厚的 Au/Cr 三电极体系，利用酶促反应原理^[105]、Nafion 膜和金纳米粒子修饰构建的生物传感器，用于检测细胞释放的谷丙转氨酶（ALT）。ALT 由细胞培养室流经蛇形通道进入圆形检测腔，蛇形通道防止两个腔室的介质相互污染。图 2.3b 的扫描电子显微镜（SEM）图像分别显示了 12.1 μm 厚的

PVDC 膜和 $1\mu\text{m}$ 孔径多孔膜的微观形态。图 2.3c 是芯片组装完成的实物图。

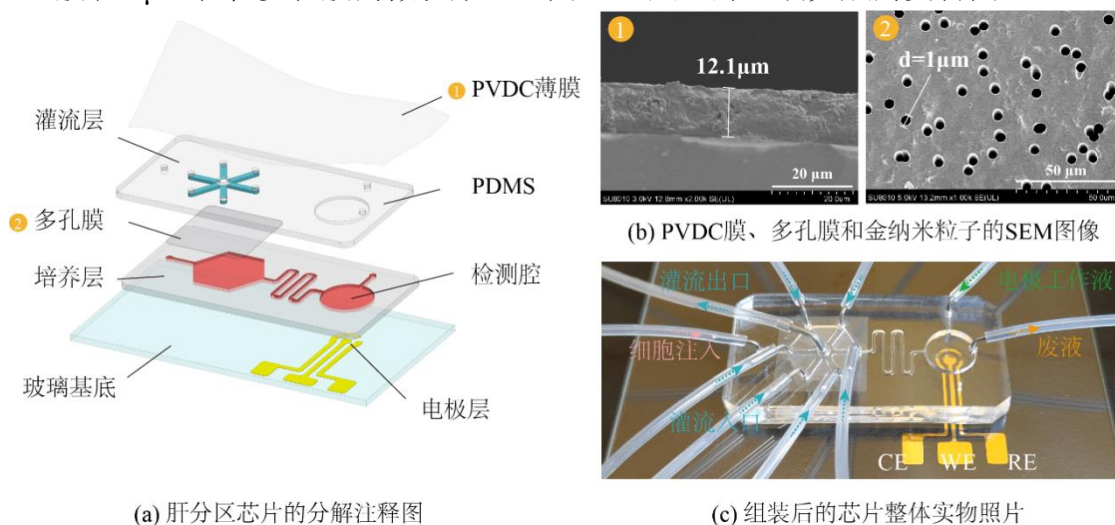


图 2.3 肝分区芯片的结构

整个芯片系统如（图 2.4）所示。一台蠕动泵驱动含氧培养基由形成往复循环，构建氧梯度的同时进行细胞培养。两台注射泵缓慢将细胞上清液（包含 ALT）注入检测腔实现电化学的动态监测。为了解决培养箱内外温差导致灌流软管产生气泡的问题，通过设置分流的储液瓶可以避免气泡产生，从而保持通道内持续稳定的流量。

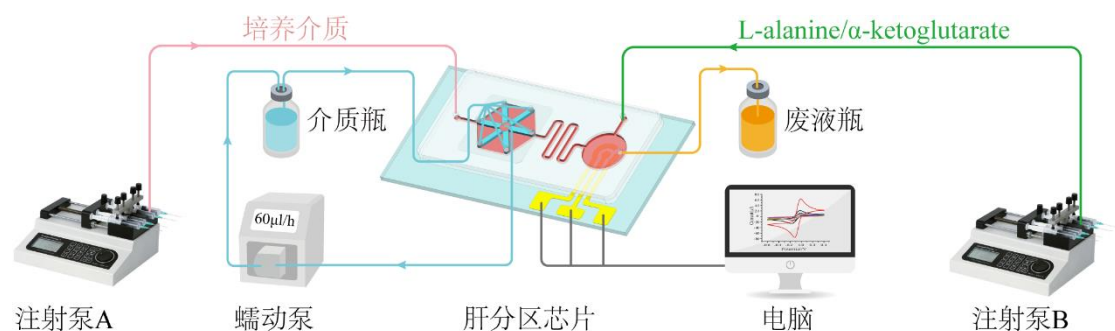


图 2.4 芯片的整体灌流系统

2.3.2 肝分区芯片中氧梯度的构建

首先基于 Michaelis-Menten 动力学，对芯片内部氧气分布（包括对流、扩散和细胞耗氧）进行了数值建模。模型结合 HepaRG 细胞最大耗氧率（ $6\text{ nmol/min}/10^6\text{ cells}$ ）^[30]，并将芯片置于环境氧含量 18.2% 的条件下（培养箱传感器测量得出）。图 2.5a 显示，芯片培养区域在初始时由于细胞自身呼吸消耗掉可形成较弱的氧梯度，但由于 PDMS 中良好的渗透性（ $5.8\times 10^{-10}\text{ cm}^3\text{ (STP) cm/cm}^2\text{ s Pa}$ ）^[99]，芯片外部的氧气通量超过了肝细胞的耗氧率。在 20min 内形成均匀氧分压，不能重现氧气梯度。

为了解决这个问题，对使用聚偏二氯乙烯（PVDC）膜涂覆芯片表面并进行了氧梯度模拟，因为它是一种柔性和自粘的聚合物膜，具有最低的透氧性之一（ $1\times 10^{-16}\text{ cm}^3\text{ (STP) cm/cm}^2\cdot\text{s Pa}$ ）^[101]。结果显示，80min 后的芯片内部仍保持稳定的氧梯度（3.7%-

8.9%)，细胞可以通过呼吸自发地耗尽培养层中的氧气而不受大气氧的影响（图 2.5b）。

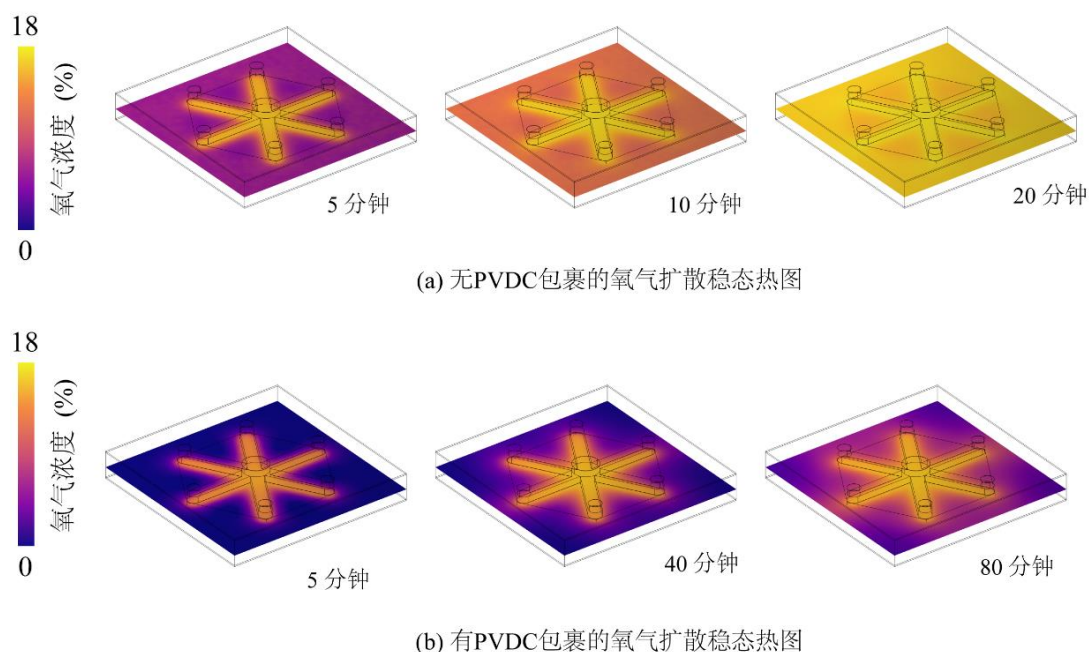


图 2.5 有无 PVDC 膜包覆的氧气扩散模拟

随后，在 1/6 肝分区芯片的三角形中线上，将形成的氧气梯度按相对位置由高至低依次定义区域 1，区域 2 和区域 3，与生理肝小叶分区直接关联^[106]（图 2.6a）。从 1/6 肝分区芯片的氧浓度热图可见，随着含氧介质的输入，氧气逐渐扩散，最终达到平衡状态（图 2.6b）并在中线上形成连续的梯度（图 2.6c）。

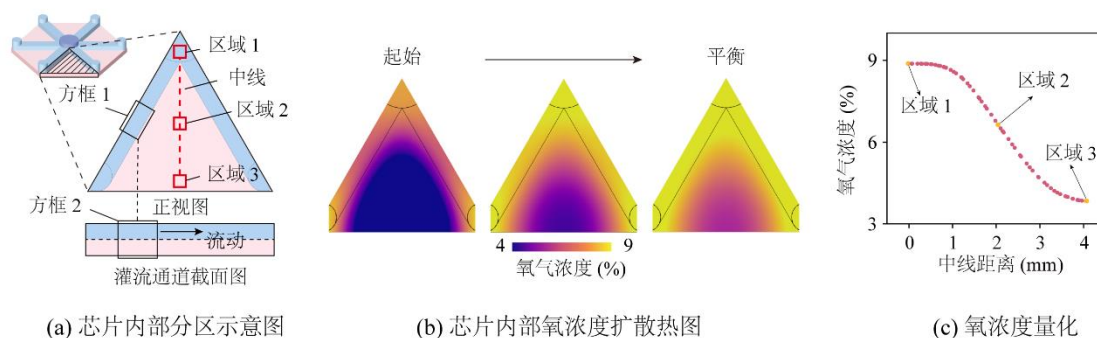


图 2.6 肝分区芯片内的区域划分

2.3.3 肝分区芯片中灌流速度的确定

为了进一步地形成与在体相近的氧梯度，研究了灌流层（上层）中的不同流速（40 μL 到 1100 μL ），在流经多孔膜后，对培养层（下层）氧气分布的影响。随着流速的增加，氧梯度范围逐渐扩大并趋于平缓（从 1.1%-4.9%到 8.9%-17.3%，图 2.7a），这归因于氧气固定的扩散速率^[107]。当流速为 60 $\mu\text{L/h}$ 时，一区的氧浓度达到 8.9%，三区的氧浓度达到 3.7%，接近人体生理氧浓度梯度 8.5%-3.9%^[81]，并且在 80min 后建立并稳定（图

2.7b)。

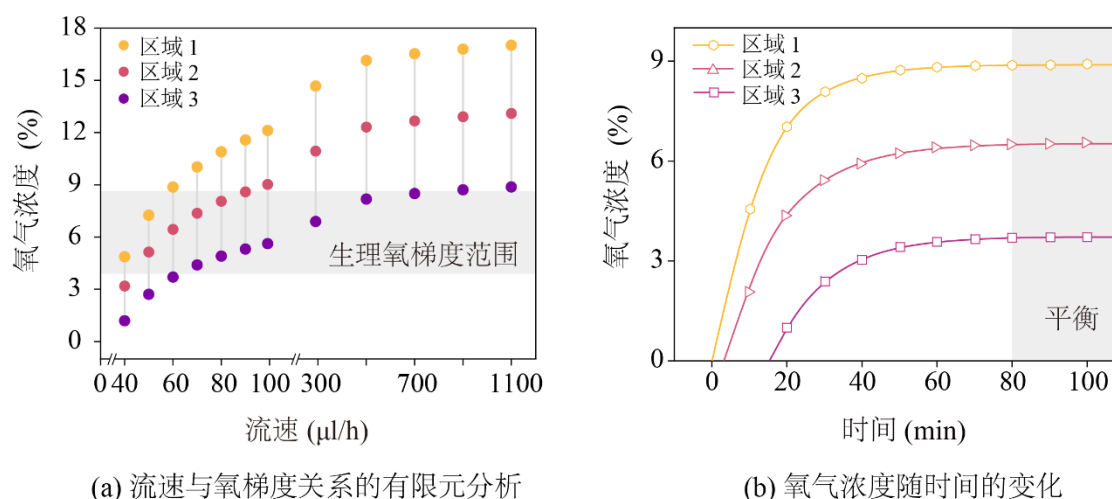


图 2.7 生理氧梯度对应的流速和形成时间

为了验证仿真结果的准确性，我们使用二氯化钌荧光标记的氧浓度传感器，对经过 60 $\mu\text{L/h}$ 灌流 24 小时后芯片内的氧气浓度进行了检测。通过求解 Stern-Volmer 方程，根据荧光强度计算培养层氧浓度的百分比。由（图 2.8）可知，芯片在区域 1、区域 2 和区域 3 分别产生了 $8.43 \pm 1.05\%$ 、 $6.71 \pm 0.83\%$ 和 $3.83 \pm 1.23\%$ 的氧气浓度，与仿真结果具有较好的一致性。在这种仿生的双层结构中，通过控制流量，在该设备中生成了区域特异性氧梯度，且与在体的梯度范围具有较好的相关性。

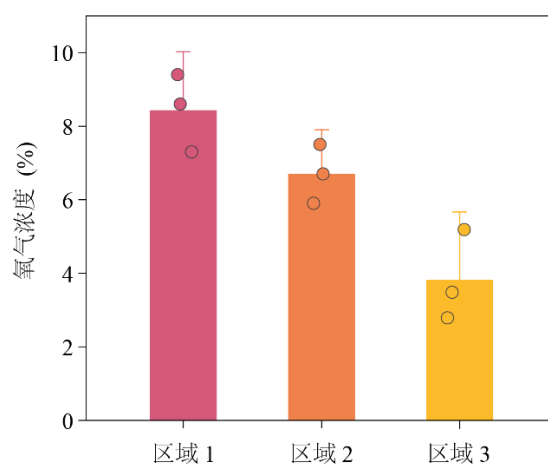
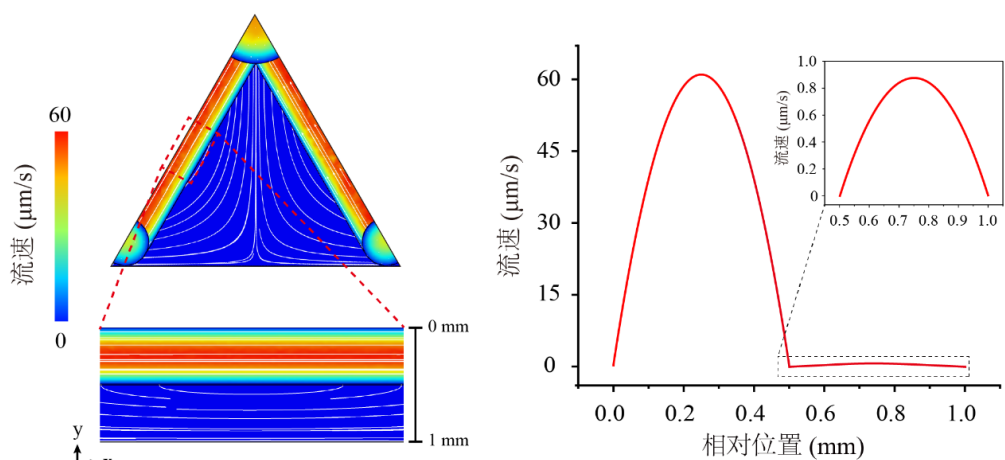


图 2.8 不同区域氧梯度的实验验证

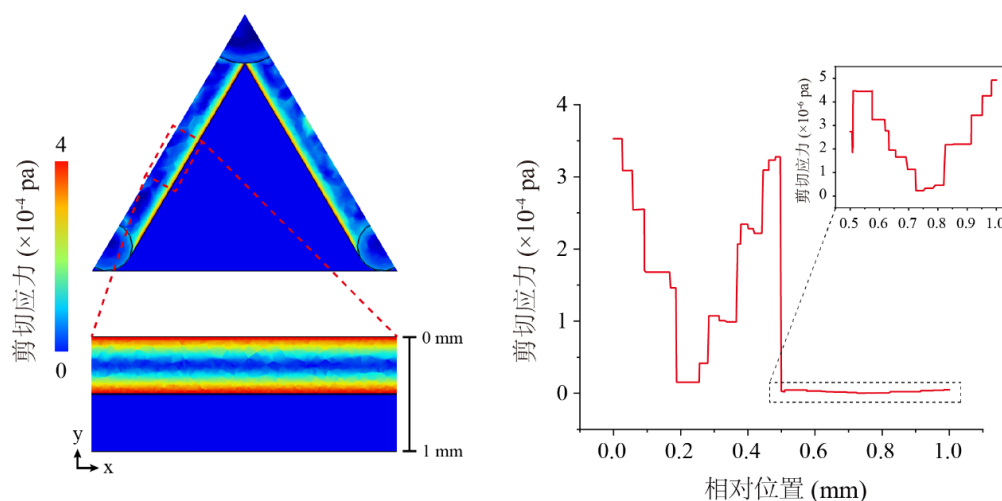
2.3.4 肝分区芯片中的流体剪切应力影响

肝细胞的功能和活力受剪切应力影响敏感。单层微流控芯片及商用装置（例如 TissUse）产生的 $4.7 \times 10^{-4} \text{ Pa}$ 剪切应力使细胞 CYP1A2 的表达下降了 20 倍^[108]。剪切应力超过 0.1 Pa，肝细胞存活率降至 28%^[91]。为了避免这个问题，数值建模芯片内的空间流场（图 2.9a），并对细胞所受的剪切应力进行分析（图 2.9b）。沿通道 y 方

向的分析结果显示，灌流通道中的速度呈抛物线分布，膜下的平均线速度和剪切应力明显低于膜上。



(a) 肝分区芯片内的流速分布



(a) 肝分区芯片内的剪切应力分布

图 2.9 肝分区芯片内的流场和剪切应力分析

随后，使用粒子图像测速（PIV）进行流场的直接实验验证。在 3.7%-8.9% 氧梯度（60 $\mu\text{L/h}$ ）的情况下，灌流层中的流线与通道平行，速度分布呈抛物线变化，符合层流流动状态（图 2.10a, b），平均线速度为 32.23 $\mu\text{m/s}$ （图 2.10c）。在每隔 2s 拍摄的通道剖面图中，膜下的荧光颗粒存在非常慢的流动（图 2.10d）。通过分析发现，上通道中的流体穿过多孔膜向下渗透到入口区域附近的下通道，并返回到出口区域周围的上通道。对应的流线呈对称分布（图 2.10e），平均线速度远小于上通道（32.69 $\mu\text{m/s}$ vs. 0.31 $\mu\text{m/s}$ ）（图 2.10f）。在此条件下，培养层的细胞所受的流体剪切应力约为 $4.5 \times 10^{-6} \text{ Pa}$ （接近 0 Pa）。这说明多孔膜对剪切应力具有很好的屏蔽作用。

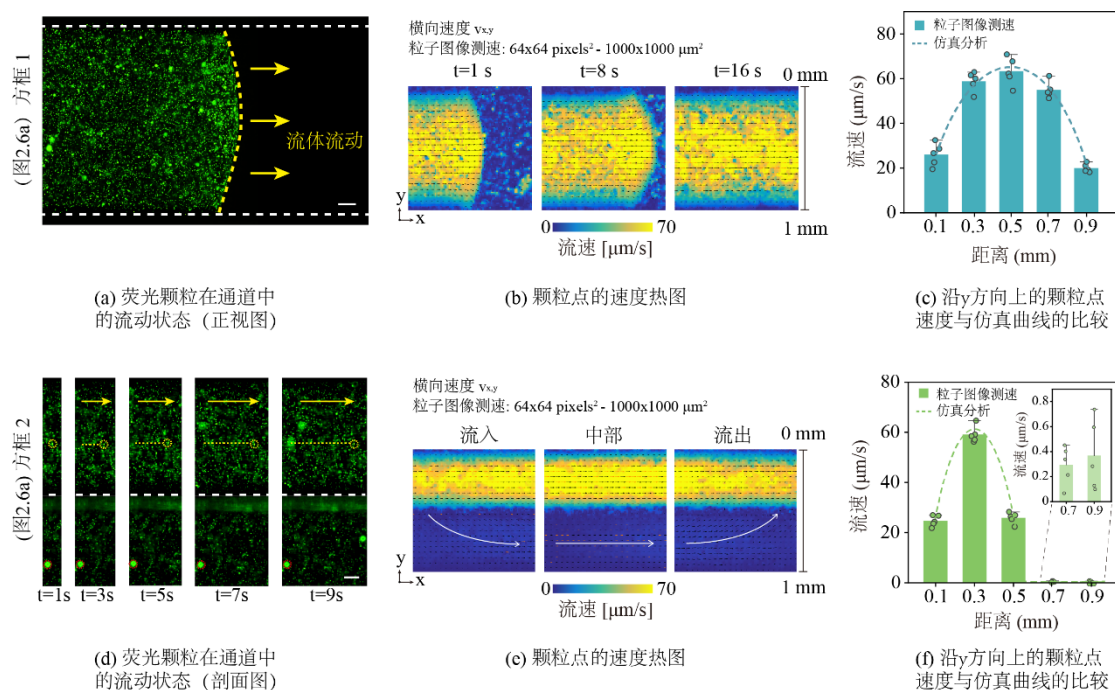


图 2.10 粒子图像测速以及与仿真结果的对比

2.3.5 肝分区芯片中的营养物质扩散程度

为了了解 3.7%-8.9%氧梯度下的流场对培养基营养成分扩散过程，数值仿真联合溶质扩散实验展示了培养介质中的主要营养分子（例如，葡萄糖）在细胞培养层内的传输过程。设置初始浓度 5.5 mol/ml 并在 60 $\mu\text{L/h}$ 的流速下灌流，初期三个分区内的葡萄糖浓度非均匀增长。随着时间变化，浓度差逐渐减小，并且在 100 min 后扩散均匀（图 2.11a, b）。

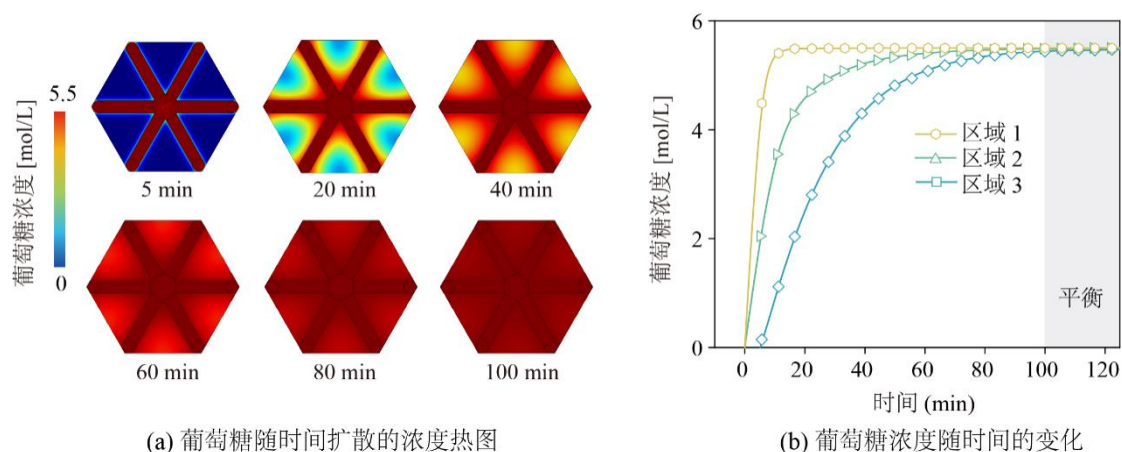


图 2.11 葡萄糖在芯片中扩散过程的仿真模拟

为了验证仿真结果，在葡萄糖溶液中添加染色剂（红色）作为标记物，视频追踪扩散过程（图 2.12）。相应时间下的扩散程度与仿真结果具有较好地一致性。这说明葡萄糖分子可以充分地覆盖整个培养层，不会产生营养分子的差异化。

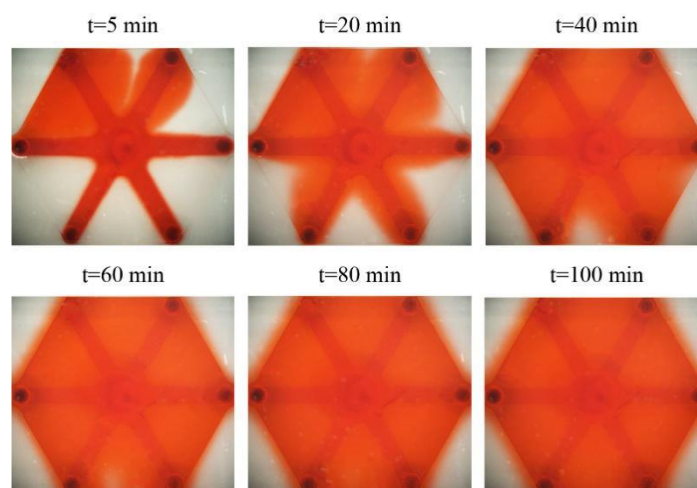


图 2.12 葡萄糖在芯片中扩散过程的实验验证

2.4 本章小结

本章节中，主要描述了肝分区芯片的设计制备以及芯片中生理氧梯度的构建。芯片通过运用环境氧对流、扩散和消耗的策略，仿生肝窦窗孔的渗透作用和血液流场，实现了贴近在体肝细胞微环境的、可控的氧浓度梯度（3.7%-8.9%）。此外，通过仿真与实验相结合的方式，验证了该氧气梯度下流场对应的剪切应力和养分扩散情况。芯片中细胞所受的剪切应力约为 4.5×10^{-6} Pa，远小于损伤阈值（0.1Pa），并且营养物质（例如葡萄糖）在 100 分钟后扩散均匀，不具有养分的差异性。肝分区芯片的成功制备为后续更好的探究氧气梯度对细胞的影响，以及探究氧梯度下非酒精脂肪肝病（NAFLD）的进展机制奠定了基础。

第3章 肝分区芯片中的细胞生长状态以及 NAFLD 的构建

3.1 引言

非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 是一种全球性的健康威胁^[82], 全球患病率从 1990-2006 年的 25.3% 增加到 2016-2019 年的 38.0%^[109]。如果不进行干预, NAFLD 会发展为纤维化、肝硬化甚至肝癌^[110]。在组织层面, NAFLD 主要表现为肝小叶中的甘油三酯 (TG) 过度积累^[111]。在发病后的几天、几周和几个月里, 肝小叶中 TG 的积累从门静脉到中央静脉之间呈现增强趋势, 引发脂肪变性^[112]。这是因为肝分区导致了细胞功能异质性, 其中门静脉周围细胞呈现脂肪酸 β 氧化功能, 中央静脉周围细胞呈现脂肪生成功能^[113]。这些观察结果表明 NAFLD 的表型特别容易受到肝脏分区的影响。然而, 肝脏分区以及相应的氧浓度梯度对 NAFLD 中细胞功能和细胞间通讯的直接影响, 目前还知之甚少, 从而限制了 NAFLD 治疗干预的发展。

本章节中, 首先表征了肝分区芯片中 HepaRG 细胞的生长状态, 包括细胞的形貌特征和功能特征。随后, 通过灌流游离脂肪酸 (FFAs) 诱导建立 NAFLD 模型。使用显微镜观察和免疫荧光染色, 观测疾病初期下脂滴积累程度以及疾病进展状态。为后续探究 NAFLD 的干预机制做好准备。

3.2 实验部分

3.2.1 细胞培养/种植的实验材料和设备

细胞培养/种植所使用的材料与设备如下表所示:

表 3.1 细胞培养/种植所使用的实验材料

材料名称	生产厂家	型号
William's E 培养基	美国 Gibco	12551032
胎牛血清	浙江天杭生物	13011-8611
双抗 (青霉素/链霉素)	大连美仑生物	MA0110
氢化可的松	美国 MCE	HY-N0583
谷氨酰胺	武汉普诺赛	PB180420
胰岛素	北京索莱宝生物	I8830
二甲基亚砜 (DMSO)	上海麦克林	67-68-5
ZO-1 mAb	美国 Abcam	ab221547

续表 3.1 细胞培养/种植所使用的实验材料

材料名称	生产厂家	型号
Albumin mAb	武汉爱博泰克	A24161
F-actin mAb	美国 Abcam	ab130935
CYP3A4 mAb	武汉爱博泰克	A22229
AlexaFluor 488	美国 Abcam	ab150113
AlexaFluor 647	美国 Abcam	ab150075
胰蛋白酶	美国 Gibco	25200-056
Matrigel 基质胶	美国康宁	356234
DAPI	大连美仑生物	MA0127
细胞活/死染色试剂	大连美仑生物	MA0361
牛血清白蛋白（d-BSA）	大连美仑生物	MB0094
磷酸盐缓冲液（PBS）	大连美仑生物	PWL050
人白蛋白 Elisa 试剂盒	武汉赛培生物	SP10526
人尿素 Elisa 试剂盒	武汉赛培生物	SP39102
油酸（OA）	上海阿拉丁	112-80-1
棕榈酸（PA）	上海阿拉丁	57-10-3
尼罗红	上海阿拉丁	7385-67-3

表 3.2 细胞培养/种植所使用的实验设备

实验设备名称	生产厂家	型号
细胞培养箱	山东博科生物	QP-160
生物安全柜	山东博科生物	BSC-1100 II A2-x
离心机	苏州国飞实验室仪器	TDL-5A
恒温干燥箱	绍兴易诚仪器	101-00B
倒置显微镜	日本尼康	TS2R
共聚焦免疫荧光显微镜	日本尼康	Ti-2
扫描电子显微镜	日本日立	Regulus8220
超临界干燥仪	德国徕卡	EM CPD 300
注射泵	保定迪创电子	LSP-02-1B
蠕动泵	保定迪创电子	BT100LC/DG6
立式蒸汽灭菌器	江苏登冠医疗	DGL-35B
酶标仪	美国安捷伦	SynergyNeo

3.2.2 细胞培养和种植

未分化的 HepaRG 细胞取自山东大学基础医学院遗传学系实验畸形学教育部重点实验室。为了分化,将细胞转移到 William's E 培养液,添加 10%胎牛血清,1%青霉素-链霉素,2 mM 谷氨酰胺,0.023 IE/mL 胰岛素和 5 μ g/ml 氢化可的松,在培养箱中(37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂)培养 2 周,然后在上述含 2%二甲基亚砜(DMSO)的培养基中培养 2 周。

在微器件制造和组装后,通过使 75% (v/v) 乙醇流过该器件并在 60 $^{\circ}$ C 的烘箱中干燥整个系统,对管道和微流体通道进行消毒。然后将干燥的装置同时暴露于紫外线和臭氧下 30 分钟。封堵灌流层后,将含有大鼠 I 型胶原的无血清 DMEM 溶液注射到培养层中,并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 小时,用于制作细胞负载的基质(ECM)。用 1ml 的胰蛋白酶/EDTA 溶液收获培养瓶中的 HepaRG 细胞,调整至 4 $\times 10^5$ cells/cm² 的浓度。使用无菌注射器轻轻地将细胞悬液注入培养层的 ECM 表面上,随后封堵培养层。在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的培养箱中无流动培养 4 小时后(细胞贴壁),使用蠕动泵以恒定的流速(60 μ L/h, 3.7%-8.9% 氧气梯度)在灌流层连续灌注培养基,确保 HepaRG 细胞通过耗氧自发的形成氧气梯度。

3.2.3 细胞活力测定

为了分析细胞在芯片流场环境中的活力,使用活/死细胞染色试剂盒进行成像。将细胞按 4 $\times 10^5$ cells/cm² 的密度分为两组培养:(i)在芯片中 60 μ L/h 循环灌流(ii)在培养皿中静态培养。第 96 小时使用染色工作液(0.01 μ M Calcein-AM 和 0.75 μ M PI)在 37 $^{\circ}$ C 下染色 30 min。

对于暴露于 FFAs 的实验,DMEM 配置的 6 组 FFAs 浓度(0, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 2 mM)施加在静态培养皿中,并分别在 24h, 48h 和 72h 对细胞进行染色分析。使用倒置荧光显微镜在 495 和 652nm 的波长下记录活细胞(绿色荧光)和死细胞(红色荧光)。Image J 软件用于计数活细胞/死细胞并计算细胞活力。

3.2.4 细胞形态分析

为了观察氧梯度引起的形貌变化,使用扫描电子显微镜(SEM)在 96 小时对 1/6 芯片细胞层进行观察。首先将芯片的灌流层剥离,PBS 清洗 3 次。使用 3% 戊二醛在 4 $^{\circ}$ C 固定 2h,PBS 清洗 3 次后使用醋酸异戊酯脱水 30min。随后置入临界点干燥器干燥,并进行 SEM 观察。

3.2.5 细胞免疫染色和成像

HepaRG 细胞使用 4%多聚甲醛固定 30 分钟,然后使用 PBS 配置的 0.2% Triton X-100 渗透 30min。使用免疫染色封闭液细胞封闭 60min。然后使用 PBS 稀释的一抗(F-actin, ZO-1, ALB 和 CYP3A4)孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜。使用相应的二抗 Alexa Fluor 488 或 647 室温避光孵育 30min。加入 DAPI 染色细胞核 10min。最后滴涂抗荧光淬灭封片液。每

个步骤之后使用 PBS 清洗三次。使用共聚焦免疫荧光显微镜对样品进行成像。使用 Image J 软件对免疫荧光图像进行定量。

3.2.6 细胞功能分析

采用酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒测定培养培养基中的生物标志物（白蛋白和尿素）。所有收集的细胞上清液样品在进行检测前在 -20°C 冷冻保存。将样品解冻至室温，并按照制造商的规程进行样品制备。使用酶标仪在 450nm 波长下检测吸光度。

3.2.7 NAFLD 的诱导

使用棕榈酸（PA）和油酸（OA）的混合物制备 FFAs 处理液。将 $19.04\mu\text{L}$ OA 溶入 3ml 0.1mol/L NaOH 中，并在 75°C 混合 30min 。随后迅速的加入 3ml d-BSA 溶液， 50°C 下助溶 30min 得到 OA 原液（ 20 mM ）。相同的方法配置 20mM PA 原液。将 PA 和 OA 原液（PA: OA = 1: 2）在无血清培养基中混合，产生一系列的 FFAs 浓度（ 0.1 , 0.2 , 0.5 , 1 和 2mM ）。在第 96 小时加入 24 孔板培养的 HepaRG 细胞中分别孵育 24 小时，48 小时，72 小时。对于芯片内的诱导，在第 96 小时将正常培养基替换为 1mM 含脂培养基，并以 $60\mu\text{L/h}$ 连续灌注 72 小时。

3.2.8 细胞脂滴染色

使用尼罗红染色定量细胞内脂滴的积累程度。取适量的尼罗红用无水 DMSO 充分溶解制备 1mM 储存液，然后使用 PBS 将储存液稀释成 $1\mu\text{M}$ 的工作液。细胞在 4%多聚甲醛溶液中室温固定 60 分钟。PBS 洗涤 3 次后，加入尼罗红工作液在 37°C 避光孵育 1h。最后加入 DAPI 染色细胞核 10min。使用共聚焦免疫荧光显微镜对样品进行成像。对于肝分区芯片内的染色，需要去除芯片顶部灌流层进行操作。

3.3 结果与讨论

3.3.1 肝分区的形貌还原

为了了解氧梯度在芯片内对细胞动力学的影响，在显微镜（明场）和 SEM 下观察其形貌变化。将 HepaRG 细胞在芯片中以流速 $60\mu\text{L/h}$ （ $3.7\%-8.9\%$ 氧梯度）循环灌流培养。结果显示，细胞播种 4 小时后贴壁良好并且分布均匀。在随后的 96 小时内，细胞形态学特征呈现区域性（图 3.1a）。其中区域 1 细胞分布较为稀疏，SEM 下可观察到 3D 组织样簇，类似在体肝索结构^[114]；区域 3 细胞分布较为密集，SEM 下形貌比较平坦（图 3.1b）。区域 2 的细胞展现了过渡形貌。

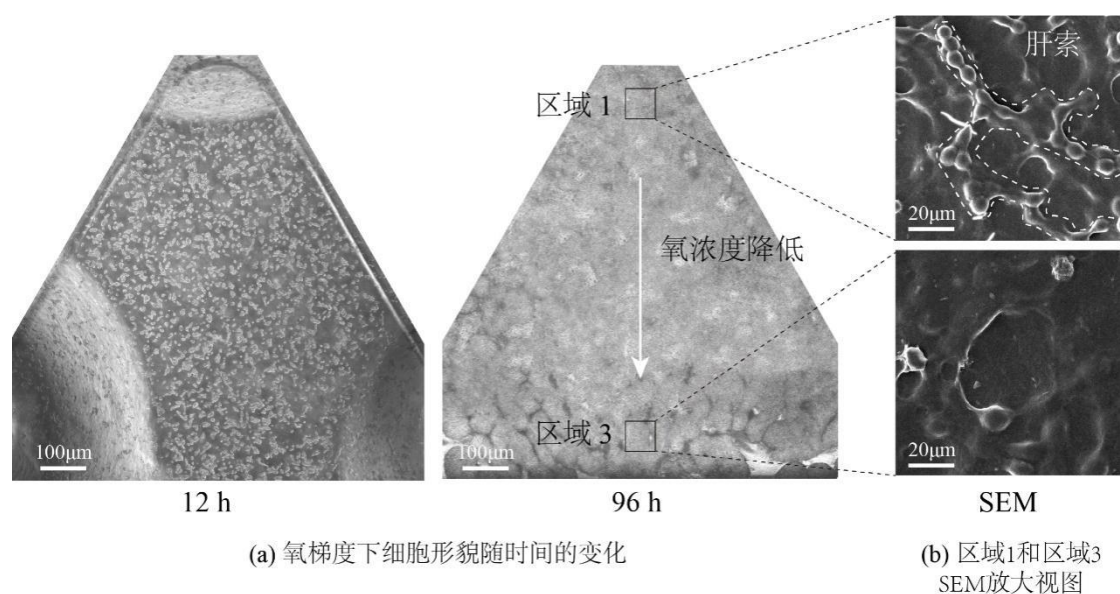


图 3.1 肝分区芯片中的细胞形貌变化

此外，通过免疫染色定量了区域 1 和区域 3 的细胞高度（图 3.2a）。培养第 96 小时细胞层垂直横截面的免疫荧光染色图像显示，区域 1 的平均细胞高度是区域 3 的 2.3 倍（ $31.3 \pm 7.9 \mu\text{m}$ 对 $13.5 \pm 3.7 \mu\text{m}$ ）（图 3.2b）。这可能是由于区域 1 处于较高的氧气浓度下，生长速率较区域 3 更快。

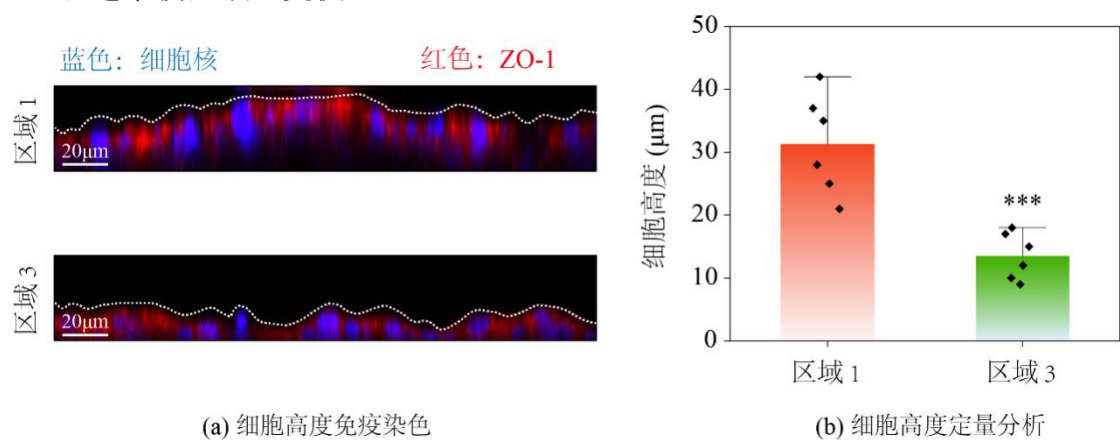


图 3.2 区域 1 和区域 3 的细胞高度对比

体外静态孔板培养的细胞表现出良好的细胞活性，已成为共识^[115,116]。通过对比静态培养和芯片内培养的细胞活性，发现两组细胞存活率无显著性差异（在第 96 小时显示出 91% vs. 88%，图 3.3a, b）。初步验证了生理氧气梯度所产生的流场对细胞活性无明显影响。

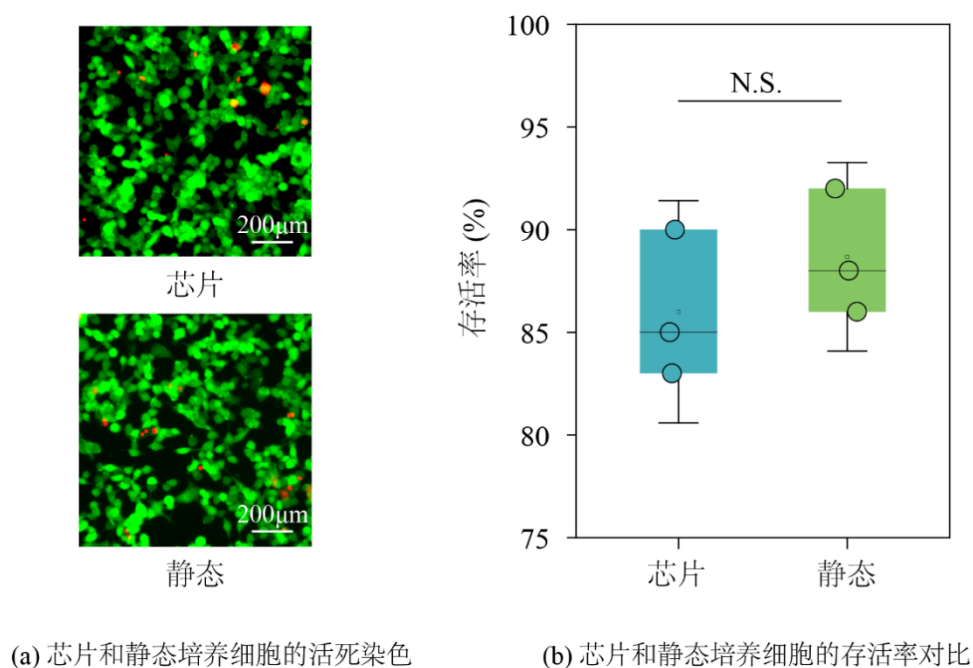


图 3.3 细胞活性对比

3.3.2 肝分区的异质性功能实现

为了进一步确定氧梯度是否促使细胞还原肝分区的异质性功能，通过免疫荧光染色，分析了在芯片中培养 96 小时后的肝细胞中肌动蛋白 F-actin、紧密连接蛋白 ZO-1、白蛋白 ALB 和代谢酶 CYP3A4 表达（图 3.4a）。与区域 3 相比，ZO-1 和 F-actin 在区域 1 的荧光强度分别高出 19.37% 和 24.11%（图 3.4b）。这表明在区域 1，HepaRG 细胞展示出更紧密的连接和成熟的细胞骨架。区域 1 的细胞 ALB 的表达量提升了 24.68%，展示出更强的蛋白合成功能。然而在区域 1 反应代谢能力的 CYP4A4 的表达下降了 36.35%。以上结果表明，在氧梯度的影响下，细胞单层的生长和分化生动地还原了在体肝小叶的关键分区特性^[117-119]。

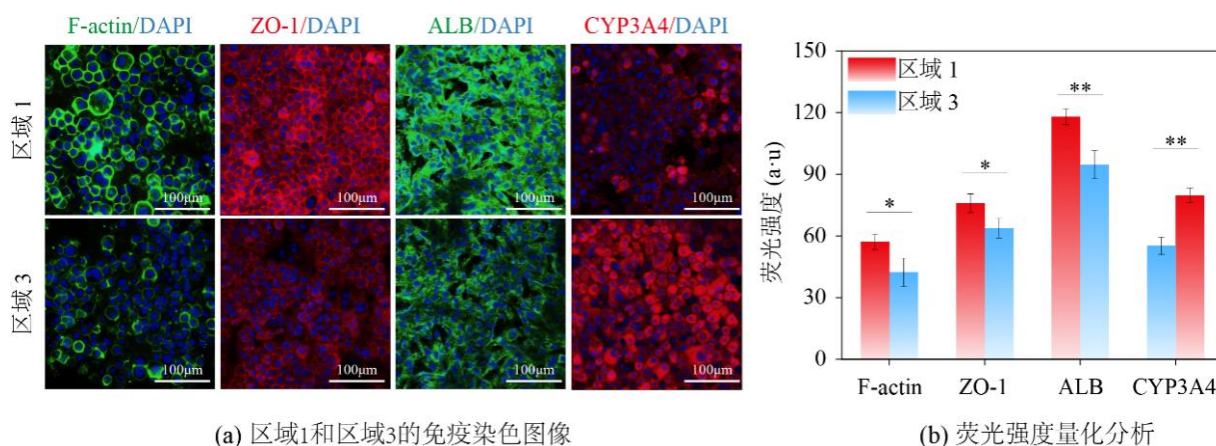


图 3.4 区域 1 和区域 3 的功能性对比

此外,我们进一步分析了细胞在静态培养和芯片培养中,连续 168 小时内白蛋白(图 3.5a)和尿素(图 3.5b)的分泌情况。白蛋白的分泌在两组显现不同的增长速率,在第 168 小时芯片内分泌是静态的 2.21 倍 (61.08 ± 2.76 ng/h/million vs. 27.67 ± 1.99 ng/h/million)。值得注意的是,在第 96 小时之后,白蛋白分泌逐渐趋于平缓,可能是由于细胞逐渐成熟。尿素的分泌在初始时芯片培养是静态培养的 2.43 倍,并且两者的分泌在随后的 168 小时内保持平缓(14.12 ± 2.09 μ g/h/million vs. 5.81 ± 0.82 μ g/h/million)。总之,芯片能促使细胞还原肝分区的异质性功能,为 NAFLD 的建模提供更好的平台。

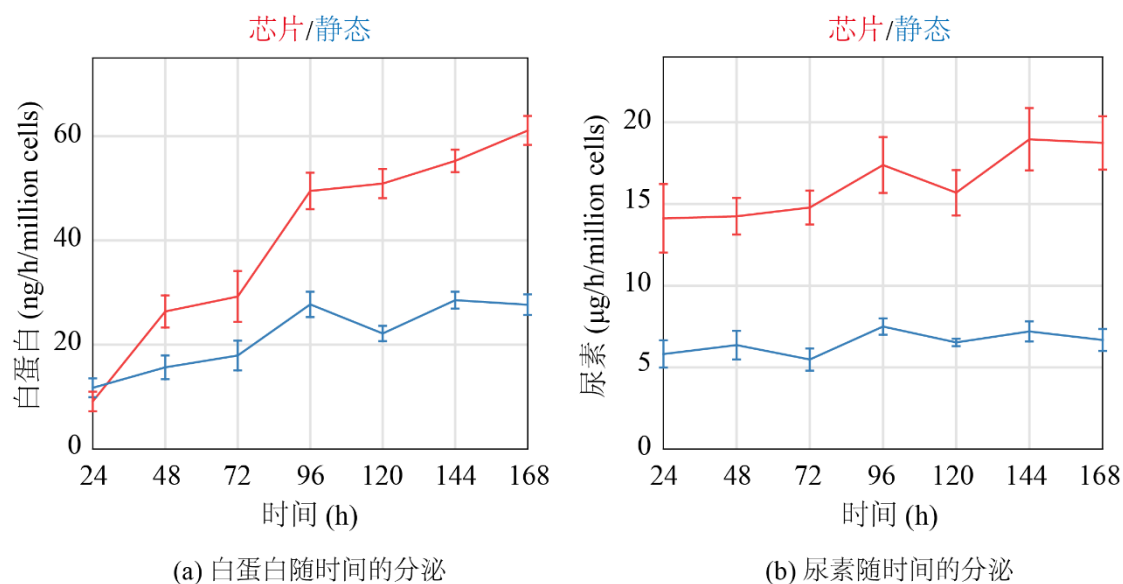
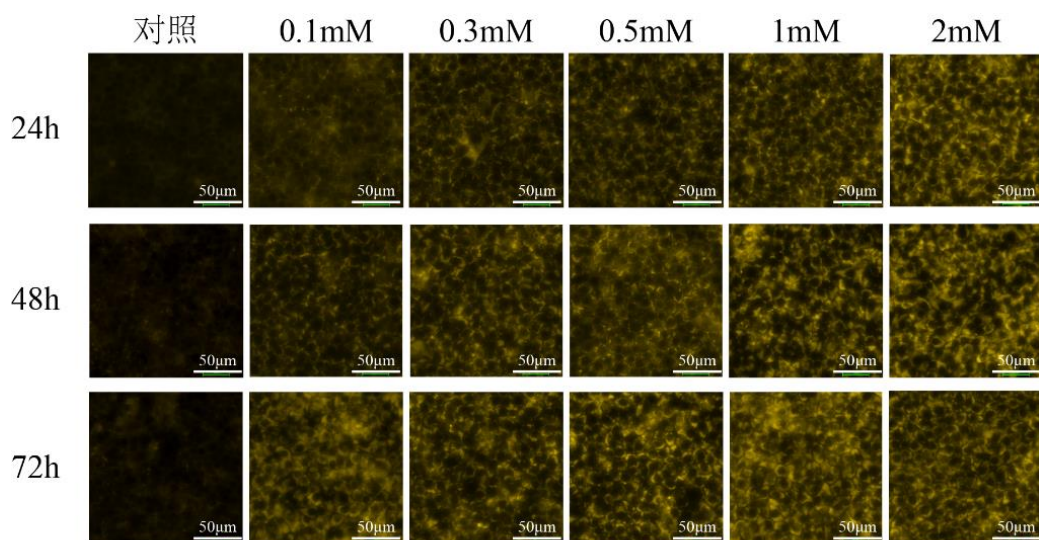


图 3.5 芯片培养和静态培养的白蛋白/尿素分泌对比

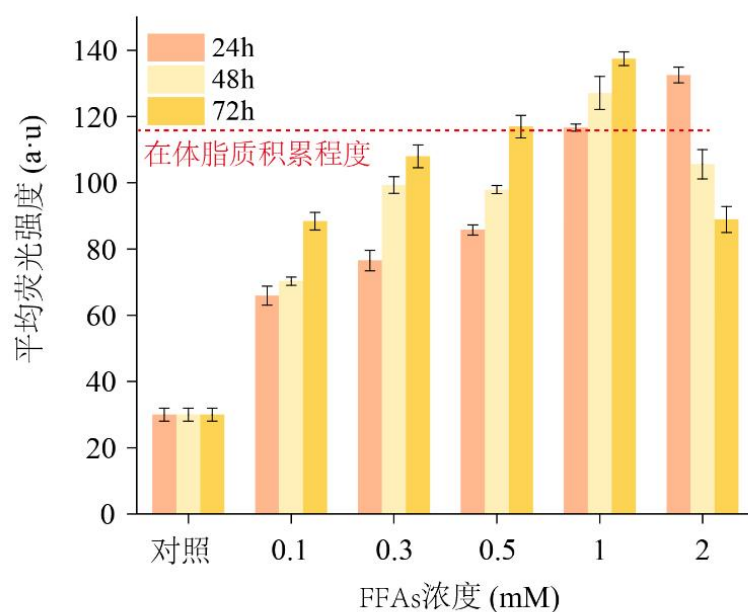
3.3.3 寻找 FFAs 合适的浓度和诱导时间构建 NAFLD 模型

游离脂肪酸 (FFAs) 积累是 NAFLD 发病的核心。在体内, FFAs 主要通过脂肪组织中甘油三酯的脂解产生。当脂肪酸供应过多或其处置受到损害时, 会导致 NAFLD 形成 [120–124]。

为了在体外构建贴近在体的初期 NAFLD 表型, 包括细胞脂质积累和较小的毒性损伤^[125,126], 需要确定合适的 FFAs 浓度和时间。使用典型的油酸和棕榈酸 (2: 1) 混合物代表 FFAs^[127,128], 并将六组 FFAs 浓度 (对照组、0.1 mM、0.3 mM、0.5 mM、1 mM 和 2 mM) 分别施加于 HepaRG, 随后在 24、48 和 72 小时评估脂肪积累程度 (图 3.6a)。在 0–1mM 浓度范围内观察到细胞的脂质积累与 FFAs 剂量和时间呈正相关, 其中 1 mM FFAs 孵育 24 小时的脂质积累比正常组高了 3.96 倍, 类似于在体的 NAFLD 表型 (在体内, NAFLD 患者的肝脏脂质积累约为正常肝脏的 3.8 倍^[129]) (图 3.6b)。



(a) 脂滴积累染色图



(a) 脂滴积累的荧光强度分析

图 3.6 不同浓度 FFAs 下的脂滴积累水平

此外，对细胞的存活率进行染色分析，以评估细胞损伤程度（图 3.7a）。结果显示，在 0-1mM 浓度范围内细胞在 72 小时内的存活率均高于 80%（图 3.7b）。然而，2 mM FFAs 孵育的细胞脂质积累在 24、48 和 72 小时呈现下降趋势，并且存活率都未达到 80%。可能是由于过量的 FFAs 对细胞造成了脂毒性。因此，选用 1mM 的 FFAs 浓度在芯片中构建 NAFLD。

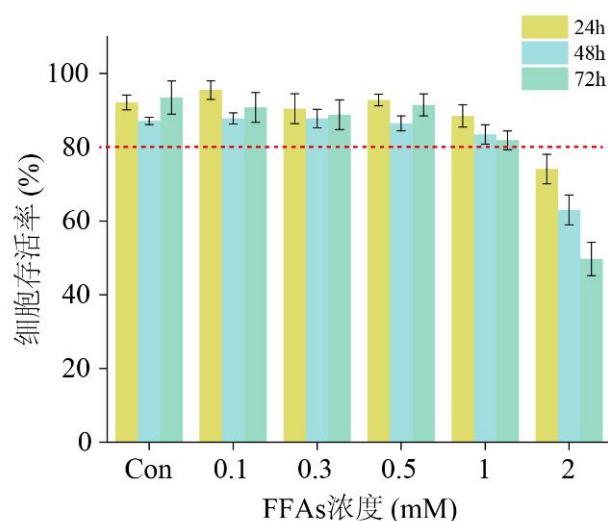
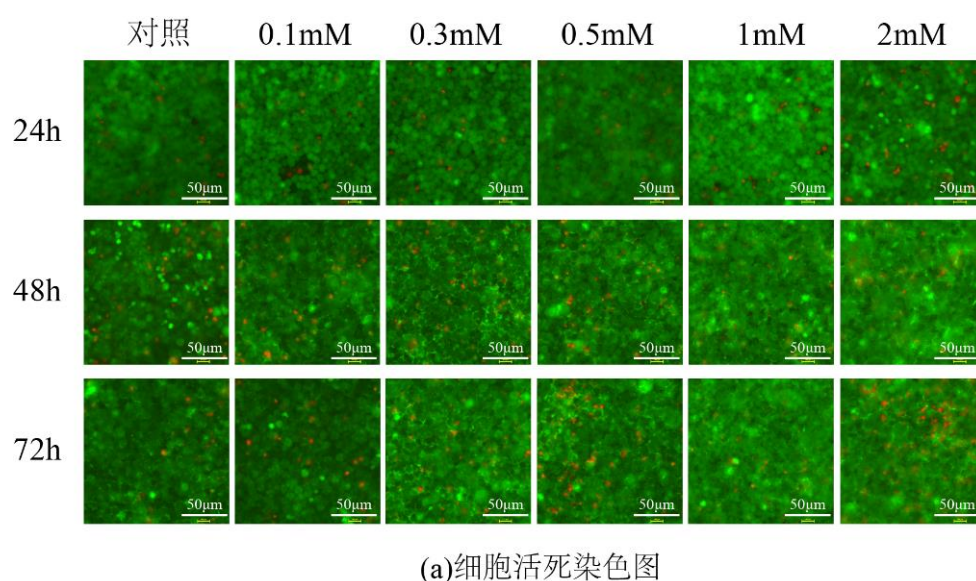


图 3.7 不同浓度 FFAs 下的细胞活性

为了确定最佳诱导持续时间，在芯片内使用浓度为 1mM 的 FFAs 进行了为期 6 天的诱导试验，并进行免疫染色分析以评估脂质积聚和细胞活力。在最初的三天里，脂质积累逐渐增加，随后从第四天开始下降（图 3.8a）。与第一天相比，第六天的脂质积累减少了 22.8%。值得注意的是，细胞存活率在第四天下降到 80% 以下（78.2%），并在随后的两天内持续下降（图 3.8b）。总之，根据观察到的趋势，选择 3 天（72 小时）的诱导期进行 NAFLD 诱导。此时间内的细胞脂质积累最丰富，并且不会对细胞造成损伤。

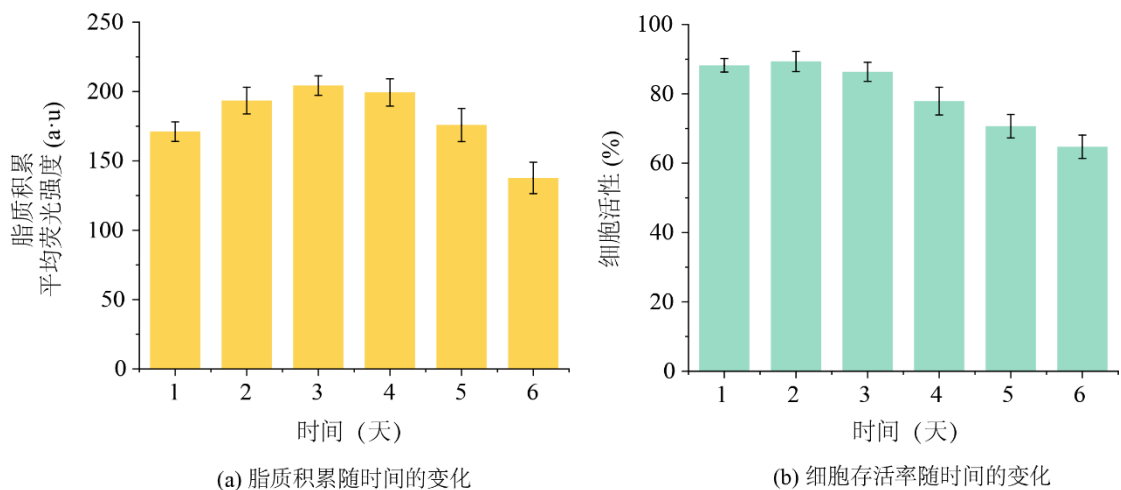


图 3.8 肝分区芯片内 FFAs 的长期毒性验证

3.3.4 NAFLD 下的细胞形貌改变

为了探究芯片中 NAFLD 对细胞形貌的影响,在肝分区芯片中循环灌注含脂培养液,用于构建 NAFLD (图 3.9a)。灌注的时间方案如图 3.9b 所示。含脂培养液(添加 1mM FFAs)在 96-168 小时通过蓝色的灌流通道进入,透过多孔膜逐渐扩散至细胞培养区域。随后使用显微镜观察细胞脂质积累变化(图 3.9c)和细胞形貌变化(图 3.10)。结果显示,脂滴(黄色)聚集在细胞核周围,与病理组织切片中的微泡组织变性类似^[130]。

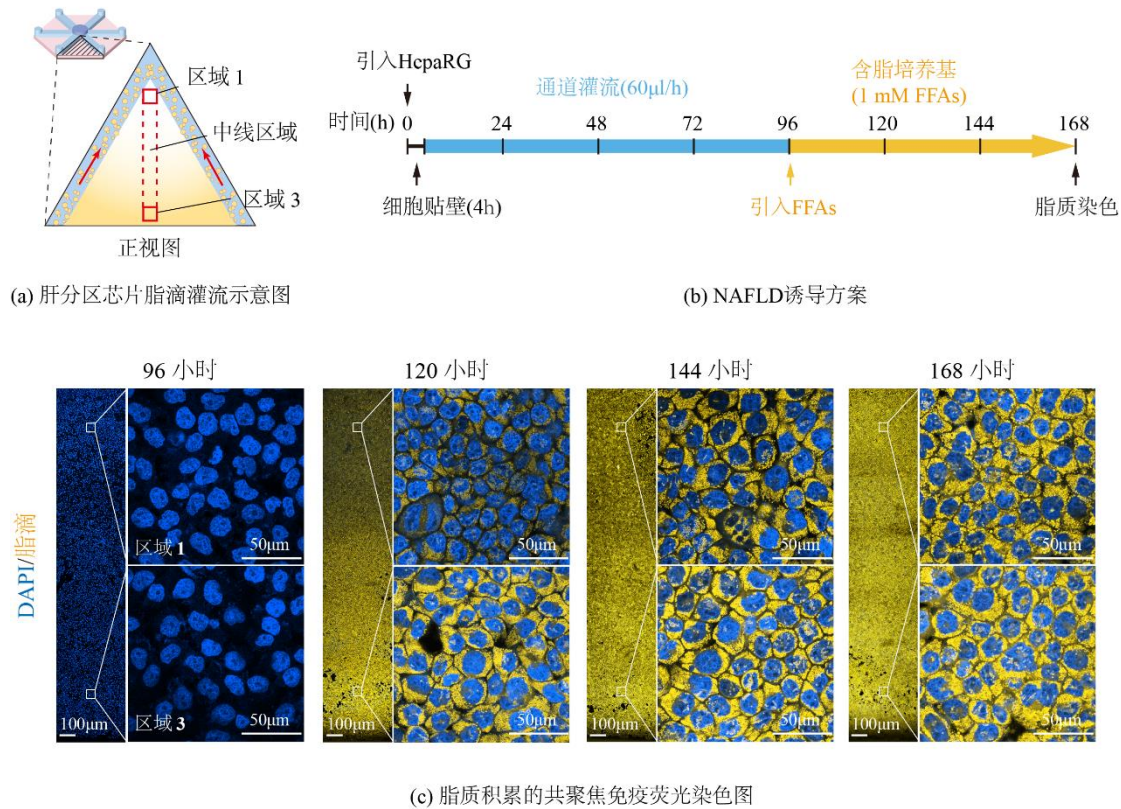


图 3.9 肝分区芯片内 NAFLD 的构建

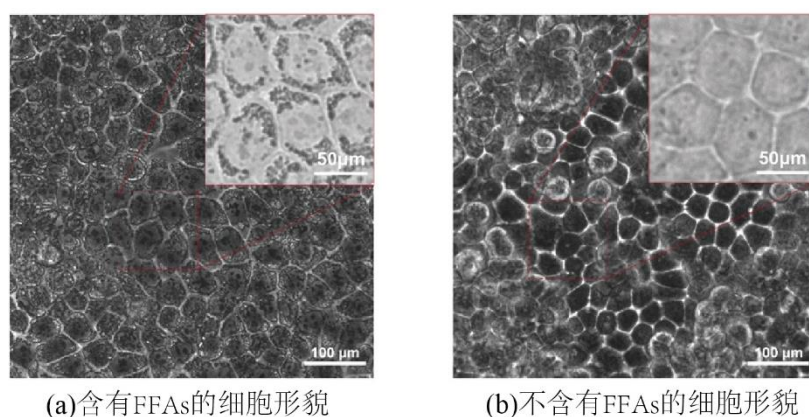


图 3.10 FFAs 对细胞的形貌影响

脂滴的荧光强度分析结果显示（图 3.11），第 120 小时区域 1 到区域 3 脂质积累呈现渐增趋势，其中区域 3 比区域 1 的脂滴积累量高了 65.28%。这可能是由于乏氧的区域 3 细胞具有较强的脂质生成能力，而富氧的区域 1 细胞具有较强的脂质分解能力。还原了在体对应区域的细胞功能，成功在芯片内构建 NAFLD 并形成与在体类似的脂质非均匀积累^[131]。在第 144 小时和第 168 小时，梯度带上的整体脂质积累分别增加了 12.65% 和 22.17%。具体而言，第 144 小时，区域 3 的脂质水平比区域 1 高 16.32%，第 168 小时高 8.45%。随着时间的推移，区域 3 与区域 1 之间的脂滴积累差距随时间增加逐渐减小，这有可能是区域 3 细胞脂滴积累达到了饱和。

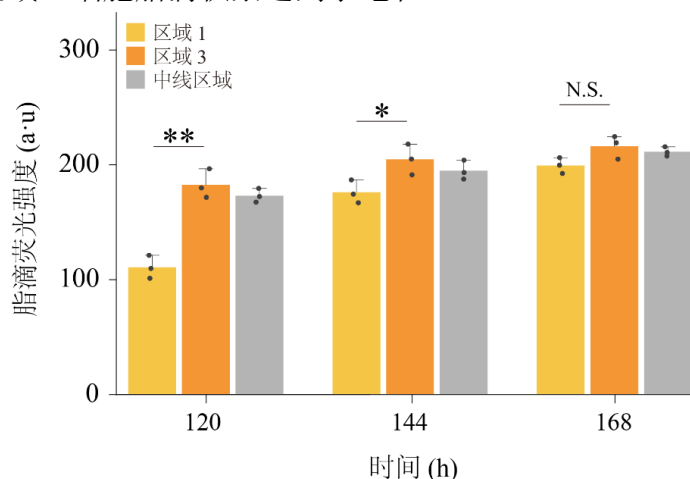


图 3.11 脂质积累的荧光强度分析

3.3.5 NAFLD 下的细胞功能影响

为了探究芯片内 NAFLD 对细胞功能性分泌物的影响，检测了 120-168 小时在有 FFA 和无 FFA 组下，细胞的白蛋白（图 3.12a）、尿素（图 3.12b）和代谢酶（图 3.12c）的表达。在 FFAs 诱导下，CYP3A4 的表达呈下降趋势，在第 144 小时和第 168 小时分别比无 FFAs 组降低了 18.14% 和 16.53%。相反的，白蛋白和尿素的分泌几乎没有受到影响。这些与先前的研究一致^[132,133]。

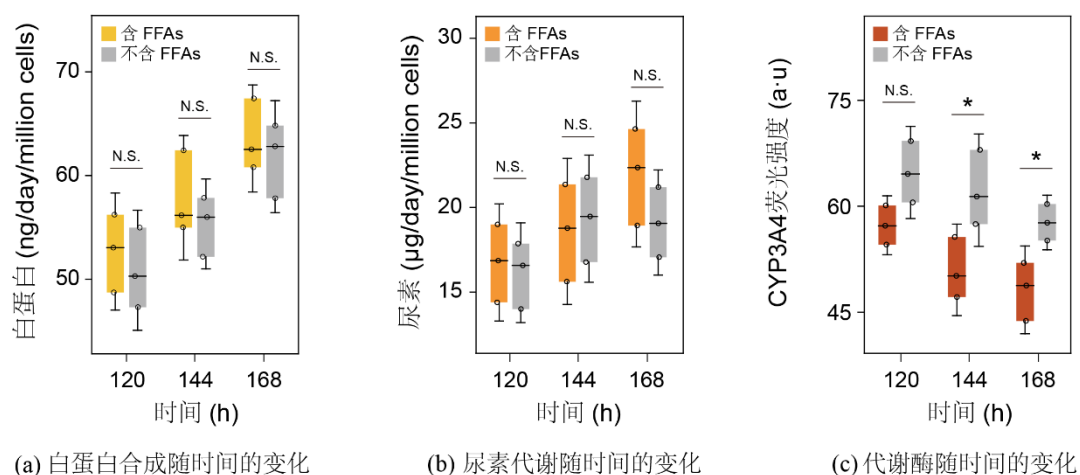


图 3.12 有无 FFAs 下的细胞白蛋白、尿素和代谢酶变化

3.4 本章小结

本章节中，主要描述了肝实质细胞在肝分区芯片中的生长状态以及非酒精脂肪肝病（NAFLD）的构建。通过对细胞的显微成像和免疫组织化学分析，证实了在氧梯度的影响下，HepaRG 细胞单层的生长和分化呈现异质性，贴近在体肝小叶分区。包括在低氧区展现出更高的密度和连接紧密性，在高氧区分化出肝索状结构。此外，芯片中培养的细胞白蛋白和尿素分泌明显高于静态培养，在第 168 小时分别是静态培养的 2.21 倍和 2.43 倍，表明生理氧梯度有助于细胞功能的实现。随后，确定了合适的 FFAs 浓度（1mM）和诱导时间（72 小时）以构建 NAFLD 模型，并观察到非均匀的脂质积累，与病理组织切片中的微泡组织变性类似。总之，本文的肝分区芯片可以使细胞还原在体肝小叶的分区特征，同时构建更符合临床表型的 NAFLD 模型，为后续的干预机制探究奠定了基础。

第4章 肝分区芯片集成 ALT 传感器探究 NAFLD 的干预机制

4.1 引言

肝脏疾病通常通过肝酶水平的升高来诊断，如谷丙转氨酶（ALT）。ALT 是一种存在于肝细胞细胞质中的胞内酶，当其释放时，表明肝细胞因质膜破裂而受损^[134]。一般健康人的血液中 ALT 水平在 50 U/L 左右，而在严重的肝损伤时可升高 100 倍^[135]。在体外研究中，对于评估试验物质的毒性以及疾病进程，这种临床标志物具有重要意义。

传统的分析方法需要手动从微流控系统中收集样品，或将培养物转移到显微镜下观察。这常常会影响系统氧气梯度的稳定性，使结果的解释变得复杂，并且准确性不足。在这种情况下，集成电化学微传感器具有重要作用^{[136][137]}。与标准细胞分析的终点检测不同，电化学微传感器可以在特定的时间点进行检测，甚至可以提供有关细胞分泌物动态的实时信息。将这种电化学传感器集成到细胞培养生物反应器中，可以动态监测细胞功能，并避免频繁的采样影响。

本章节中，主要介绍了 ALT 传感器与肝分区芯片的集成以及 NAFLD 机制的探究。使用真空气相沉积的方式制备三金电极并修饰金纳米粒子提高检测能力。待电极修饰完成后，对灵敏度、检测限、一致性、稳定性和准确性进行表征。随后，连续 168 小时监测静态组和芯片组内培养的细胞释放的 ALT。通过调节氧浓度梯度区间，观察 ALT 的释放变化，深入探究 NAFLD 的干预机制。

4.2 实验部分

4.2.1 制备基础传感器以及疾病机制探究的材料和设备

制备 ALT 传感器以及疾病机制探究所使用的材料与设备如下表所示：

表 4.1 制备 ALT 传感器以及疾病机制探究所使用的实验材料

材料名称	生产厂家	型号
戊二醛	上海阿拉丁	111-30-8
Nafion 溶液	上海阿拉丁	31175-20-9
牛血清白蛋白（BSA）	大连美仑生物	MB4219
谷氨酸氧化酶	美国 sigma	39346-34-4
谷丙转氨酶	美国 sigma	9000-86-6
α -酮戊二酸	上海麦克林	K812223

续表 4.1 制备 ALT 传感器以及疾病机制探究所使用的实验材料

材料名称	生产厂家	型号
超纯氮气	德洋特种气体	-
普通氮气	德洋特种气体	-
四氯金酸	国药化学试剂	10010711
铬颗粒 (Cr)	蒂姆新材料	-
金颗粒 (Au)	蒂姆新材料	-
L-丙氨酸	上海麦克林	A6198
TNF- α 试剂盒 (Elisa)	上海酶联生物	ML077385
IL-1 β 试剂盒 (Elisa)	上海酶联生物	ML058059
ALT 试剂盒 (Elisa)	上海酶联生物	ML064266
Hif-2 α pAb	美国 Abcam	ab109616
β -catenin pAb	美国 Abcam	ab32572
2',7'-二氯荧光素二乙酸酯	上海阿拉丁	2044-85-1

表 4.2 制备 ALT 传感器以及疾病机制探究所使用的实验设备

实验设备名称	生产厂家	型号
氧等离子清洗机	郑州成越科技	CY-P2L-B
离心机	苏州国飞实验室仪器	TDL-5A
恒温干燥箱	绍兴易诚仪器	101-00B
超声清洗机	深圳春霖超声波科技	CR-010S
电化学工作站	瑞士万通	PGSTAT302N
蒸镀机	美国 Angstrom	08336
注射泵	保定迪创电子	LSP-02-1B
蠕动泵	保定迪创电子	BT100LC/DG6
倒置显微镜	日本尼康	TS2R
共聚焦免疫荧光显微镜	日本尼康	Ti-2

4.2.2 ALT 传感器的制备

在玻璃基板用无水乙醇超声清洗 30 分钟, 然后氮气吹干表面。接着, 经过氧等离子清洗, 在玻璃基底上通过阴影掩蔽技术制备微电极。设计的 ALT 检测微电极采用了三电极配置: 金参比电极 (RE), 金对电极 (CE), 和金工作电极 (WE)。通过真空气相沉积在干净的玻璃基板上制备 Cr (10 nm) /Au (200 nm) 层, 掩模版附着在其上。Cr 层作为 Au 层的粘附促进剂。最后将金电极先后用乙醇和去离子水清洗, 然后在过氧化氢

溶液中浸泡 5 分钟以清洁电极表面，接着用去离子水冲洗并用氮气吹干。

4.2.3 ALT 传感器的修饰

为了提高传感器的灵敏度以及检测性能，对工作电极表面进行纳米材料的修饰。将电极置于 $2\text{mM HAuCl}_4(0.5\text{M H}_2\text{SO}_4)$ 中。使用电化学工作站在 -0.3 V 恒电位下沉积 175s, AuNPs 固定于工作电极表面。用超纯水清洗后，干燥处理。使用高精度移液管在超纯水中混合并制备含有 0.5% (v/v) 戊二醛、2.0%BSA (w/v) 和 0.2%Nafion (v/v) 的膜溶液。在膜溶液中加入谷氨酸氧化酶，确保每个电极中的活性达到 0.05 U。将 $1\mu\text{L}$ 的这种混合物分配到金电极的表面，并在室温下干燥 1 小时。在使用前将电极在 0.01M PBS 缓冲液中于 4°C 下储存过夜。

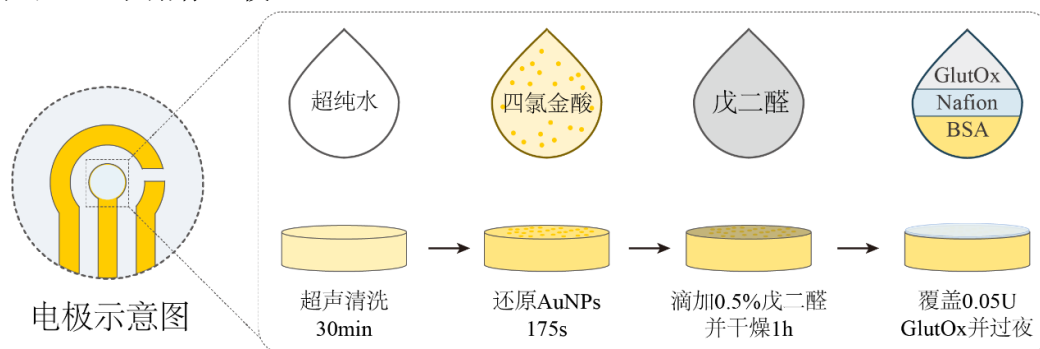


图 4.1 ALT 传感器的修饰步骤

4.2.4 ALT 传感器的校准

为获得 ALT 传感器的校准曲线，采用 I-T 法检测 6 组浓度 (5 U/L 、 10 U/L 、 15 U/L 、 20 U/L 、 25 U/L 、 30 U/L) 的 ALT 溶液。使用 PBS (PH 7.4) 配置 $10\mu\text{L}$ ALT 标准溶液，加入 $20\mu\text{L}$ 100mM α -酮戊二酸和 $70\mu\text{L}$ 1M L-丙氨酸作为反应底物。施加 0.4V 的恒电位对每个浓度至少测量三次，并记录 100s 内的电流变化。通过 Origin 2020 软件得到电流变化速率与浓度之间的线性回归方程。在实验期间，整个装置放置在 37°C 的培养箱中，以保证固定在传感器上的酶的稳定性。

4.2.5 ALT 释放的动态监测

在细胞培养 96 小时发育成熟后，通过蠕动泵将含有 1mM FFAs 的无血清培养基进行循环灌注 ($60\mu\text{L/h}$)。检测时，蠕动泵停止灌注，注射泵 A 缓慢地将培养层的上清液推至电极腔。与此同时， α -酮戊二酸和 L-丙氨酸以同样的速度被注射泵 B 推入并与待测溶液混合。检测完成后使用注射泵 A 将混合溶液推至废液瓶。采用电化学工作站连接三电极传感器，每 24 小时（后续每隔 8 小时）检测一次电极腔中的 ALT 含量。静态培养的孔板中加入 2ml 含 1mM FFAs 的无血清培养基，每 24 小时取上清液检测。

4.2.6 ALT 传感器的准确性验证

为了验证生物传感器检测 ALT 的准确性，在芯片中的不同时间点 (120 、 144 和 168

小时）收集代谢液。使用电化学传感器和 Elisa 检测代谢溶液中的 ALT（图 4.2）。芯片内集成的传感器与金标准 Elisa 相比，在 120, 144, 168 小时 ALT 分泌检测结果无显著性差异，表现可靠，并且实现了独特的动态监测。

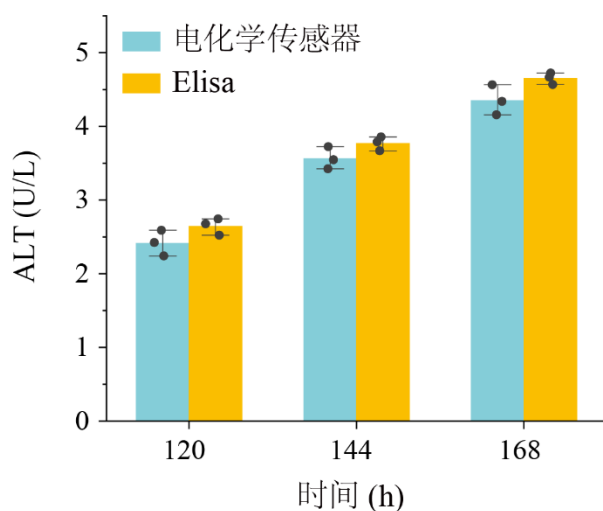


图 4.2 Elisa 和生物传感器的性能比较

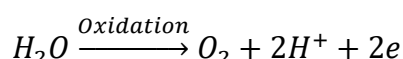
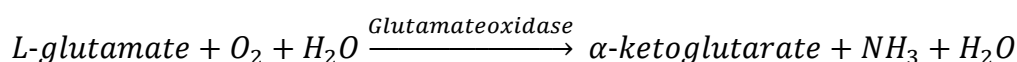
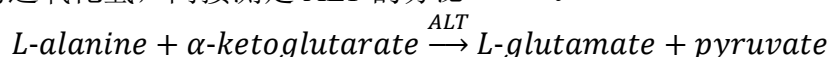
4.2.7 ROS 检测

使用 2', 7'-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 对细胞内 ROS 进行标记。第 168 小时在芯片内的细胞被去除培养液，PBS 清洗三次。使用 DMEM 配置 10 μ M 的 DCFH-DA 溶液，并覆盖住细胞。37℃培养箱内孵育 30min，随后用预热的 DMEM 清洗干净，充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。使用共聚焦免疫荧光显微镜对样品进行成像。

4.3 结果与讨论

4.3.1 ALT 传感器的检测原理和标定

谷丙转氨酶 (ALT) 是反应肝细胞损伤程度的典型生物标志物^[135,138]。为了探究 NAFLD 对细胞损伤情况，将检测细胞分泌物的电化学传感技术整合到肝分区芯片中，用于测量细胞释放的 ALT。采用真空气相沉积的方式在玻璃基底上制备了三金电极，并附着在肝芯片的检测腔下方。图 4.3 中的示意图显示了 ALT 传感器的谷氨酸氧化酶修饰步骤和酶促反应原理（原理如下）。传感器基于金纳米粒子信号放大作用，通过检测谷氨酸转化产生的过氧化氢，间接测定 ALT 的分泌^[105,136]。



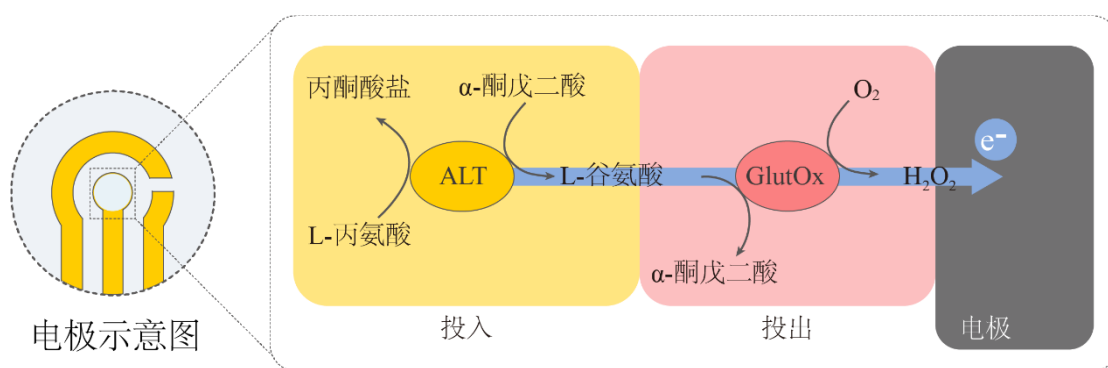


图 4.3 ALT 传感器的检测原理

图 4.4a 显示了在 310 K (37°C)，添加已知浓度的 ALT 标准溶液时， H_2O_2 氧化产生的电流在 100 秒内显示出稳定的线性响应。当 ALT 浓度从 5 U/L 到 30 U/L 时，电流增长率从 3.5 nA/min 持续增加到 28.7 nA/min，拟合曲线为： $I \text{ (nA/min)} = 0.9423C \text{ (U/L)} - 1.9741$ ， $R^2 = 0.9981$ ， $n = 3$ （图 4.4b）。ALT 的计算灵敏度为 $0.9423 \text{ nA min}^{-1} \text{ U L}^{-1}$ ，检测下限为 1.48 U/L。其中工作溶液里的反应物浓度（L-丙氨酸和 α -酮戊二酸）分别为 1M 和 100mM^[136]。

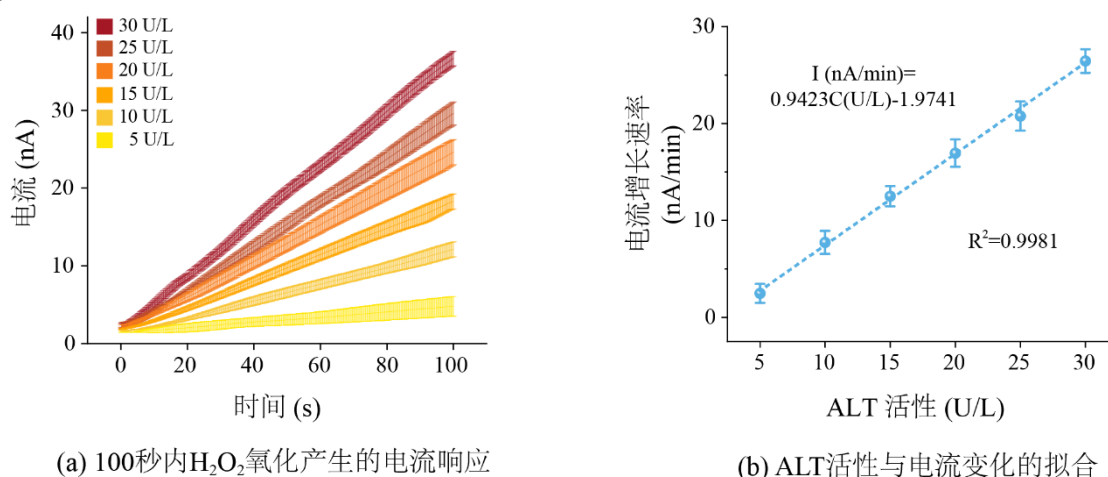


图 4.4 ALT 传感器的标定

4.3.2 ALT 传感器的一致性和稳定性

一致性和稳定性是传感器的重要特性。通过使用同一批次制备的五个传感器测量同一浓度 ALT (10 U/L) 来评估传感器的一致性。传感器电流增长速率的相对标准偏差 (RSD) 为 2.3%，显示出良好的一致性（图 4.5a）。为了验证电极的稳定性，在 25 天的时间里，每五天测量一次 10 U/L ALT 的电流响应。结果显示，电流增长速率是最初的 84%，表现出良好的稳定性（图 4.5b）。传感器在两次测量之间以 4°C 的温度存储在 PBS 缓冲液中。

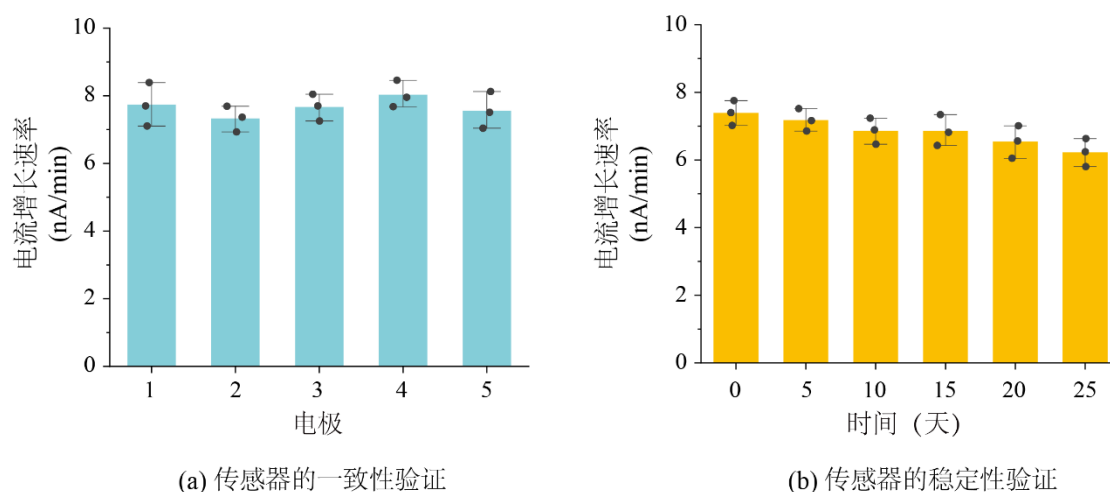


图 4.5 ALT 传感器的一致性和稳定性

4.3.3 动态监测 NAFLD 诱导的细胞损伤

为了在氧梯度下探究 NAFLD 对细胞损伤随时间的演变，使用集成在芯片中的生物传感器，连续 168 小时检测了静态组和芯片组内培养的细胞释放的 ALT（图 4.6）。结果显示，在前 96 小时内两组细胞 ALT 的释放量无明显差异。在第 96 小时加入 FFAs 后，第 120 小时芯片内的 ALT 释放量急剧增多（ $0.64 \pm 0.20 \text{ U/L}$ 到 $2.41 \pm 0.17 \text{ U/L}$ ），增长率达 276.56%。相比之下，静态培养的细胞 ALT 释放增长较为平缓（ $0.74 \pm 0.19 \text{ U/L}$ 到 $0.90 \pm 0.20 \text{ U/L}$ ），增长率为 21.62%。第 168 小时芯片内的细胞损伤是静态培养的 4.67 倍。氧梯度的存在使 NAFLD 下的细胞受到比传统静态模型（20%均匀氧环境）更强的损伤。

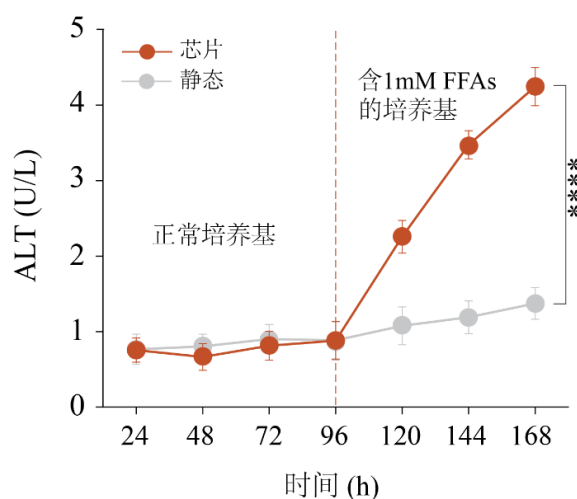


图 4.6 芯片和静态培养的细胞 ALT 释放动态监测

4.3.4 氧梯度对于 NAFLD 进程的调控

为了探究氧梯度下 NAFLD 损伤更强的原因，以及在临床上寻找对应的治疗策略，

对四组氧气梯度区间（1.1%-4.9%、3.7%-8.9%、5.6%-12.3%和 8.9%-17.3%）下 ALT 释放进行评估。疾病诱导按照时间轴（图 3.9b）在第 96 小时进行，四组氧气梯度下 ALT 的释放均呈现出增长的趋势。在第 168 小时，1.1%-4.9%、3.7%-8.9%、5.6%-12.3%和 8.9%-17.3%区间下的细胞 ALT 释放浓度分别为 5.15 ± 0.26 U/L、 4.35 ± 0.21 U/L、 3.36 ± 0.23 U/L 和 2.58 ± 0.21 U/L（图 4.7）。与 1.1%-4.9%区间相比，3.7%-8.9%、5.6%-12.3%和 8.9%-17.3%区间下的细胞受损程度分别减少了 15.53%、34.75%和 49.90%。总结来说，氧梯度区间的升高可以减少 NAFLD 对细胞的损伤，相反，氧梯度区间的降低可以加剧 NAFLD 对细胞的损伤。

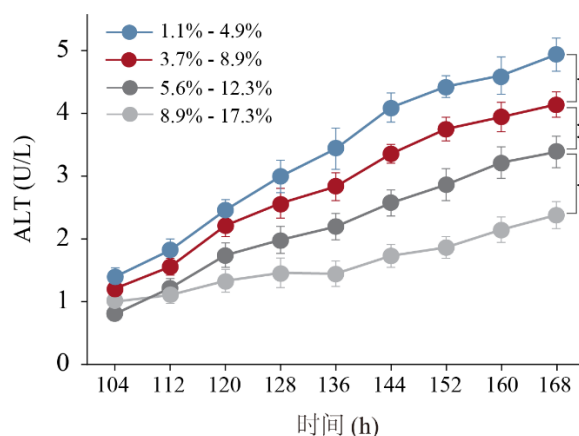


图 4.7 不同氧气梯度区间下 ALT 释放监测

为了进一步推测细胞损伤是否代表着疾病进程，在第 168 小时检测了 NASH 的相关炎症标志物 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ ^[139,140]（图 4.8a, b）。相较于生理氧梯度，在 1.1%-4.9%区间下， $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ 的表达分别上升了 16.51%和 15.98%，意味着氧梯度减少促使 NAFLD 向着 NASH 发展。相反，相较于生理氧浓度梯度，氧梯度增加到 8.9%-17.3%区间， $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ 的表达逐步减少了 32.71%和 42.25%，意味着 NASH 炎症的减缓。此外，相较于传统的 20%均匀氧条件下培养，氧气梯度条件下 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ 的表达均显著增加，这表明肝分区芯片为深入研究 NAFLD 进展机制提供了一个更为精准的平台。

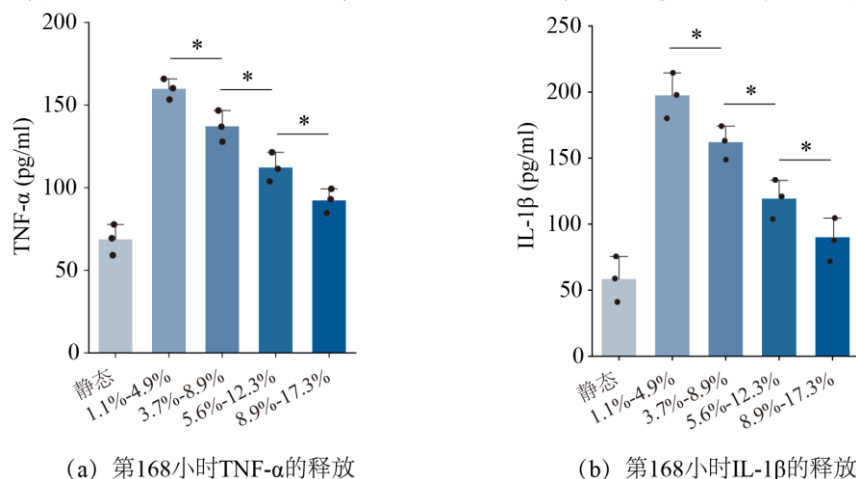
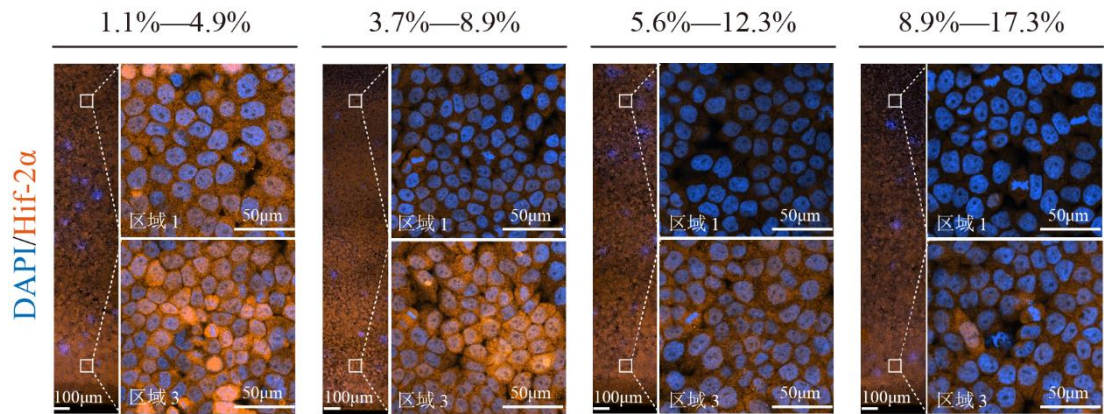


图 4.8 不同氧气梯度区间下 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ 的释放检测

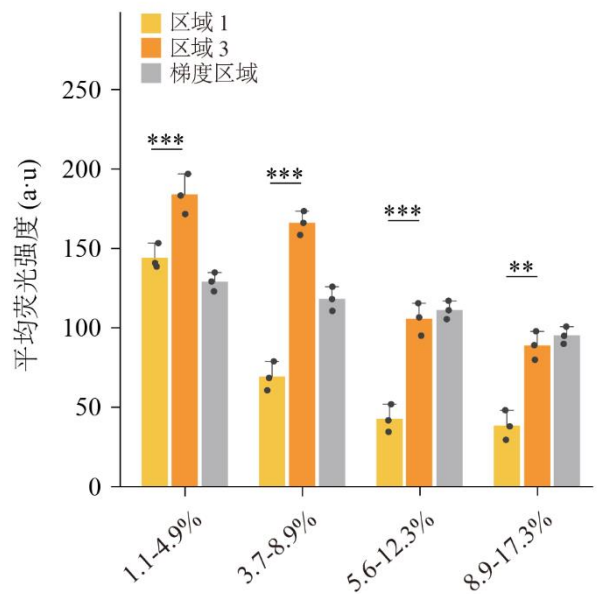
4.3.5 探究 NAFLD 进程的干预机制

为了进一步探究氧梯度对 NAFLD 进程的调控机制,评估了肝细胞内涉及氧气浓度、脂质生成和细胞损伤的相关关键蛋白和因子表达。根据先前的研究^[141-143], 筛选出三种相对应的蛋白和因子 (hif-2 α 、 β -catenin 和 ROS), 并在第 168 小时分别对其进行免疫染色和荧光强度分析。

鉴于氧梯度区间的变化直接控制着 NAFLD 进程, 评估了与细胞慢性缺氧直接相关的因子 hif-2 α 表达 (图 4.9a) ^[144]。在所有四组氧气梯度区间中, 氧梯度下的 hif-2 α 表达在肝分区的区域 1 (富氧) 至区域 3 (乏氧) 呈现渐强变化 (图 4.9b)。随着氧梯度区间的增加, hif-2 α 表达受到直接影响并整体下调。与 1.1%-4.9%相比, 对于 3.7%-8.9%、5.6%-12.3%和 8.9%-17.3%, hif-2 α 的表达分别整体降低了 8.39%, 13.86%和 26.27%, 呈现负相关性 (图 5e)。



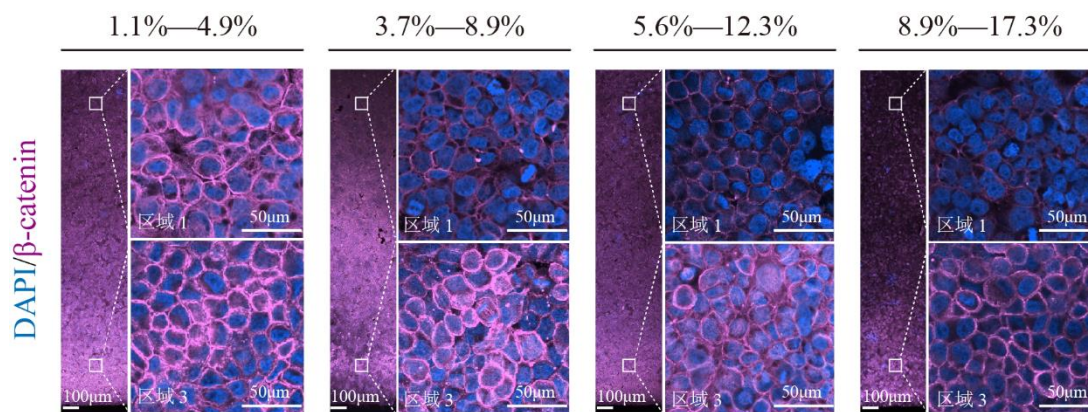
(a)不同氧梯度区间下Hif-2 α 的免疫荧光图像



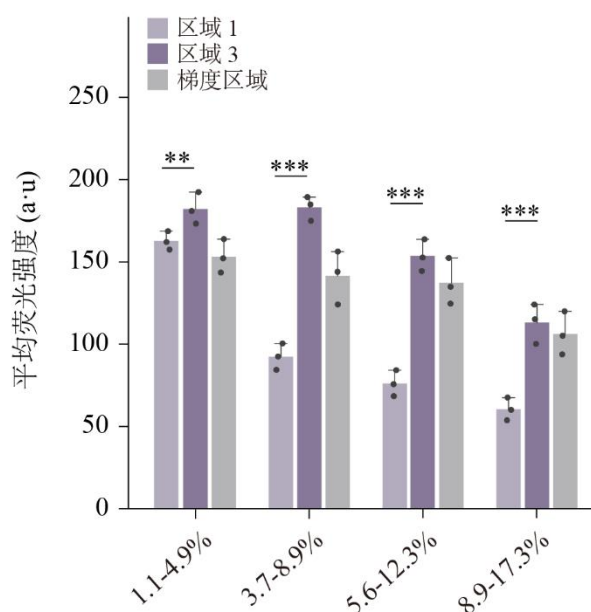
(b)Hif-2 α 的平均荧光强度分析

图 4.9 不同氧气梯度区间下 Hif-2 α 蛋白的表达

肝细胞 β -catenin 蛋白调节脂肪生成^[145], 脂肪过度堆积加速疾病进展。为此, 对 β -catenin 表达进行了评估 (图 4.10a)。在所有四组氧气梯度区间中, β -catenin 表达在区域 1 到区域 3 之间同样呈现渐增趋势。随着氧梯度区间的增加, β -catenin 表达整体下调 (图 4.10b)。与 1.1%-4.9% 相比, 8.9%-17.3% 下 β -catenin 的表达降低了 30.69%, 呈现负相关性。基于氧梯度直接调控 hif-2 α 的表达, 并且其与 β -catenin 的表达高度相似, 因此推测 hif-2 α 可能进一步调节了 β -catenin 的表达活性。



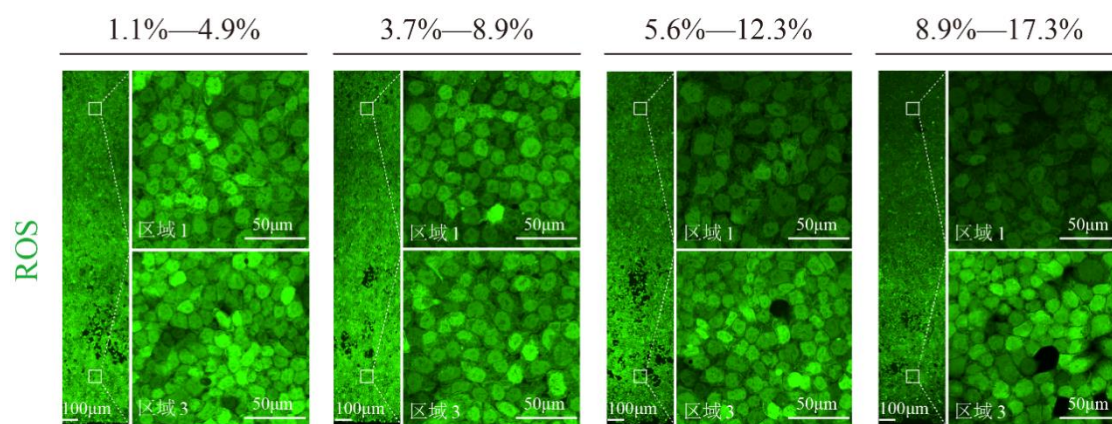
(a)不同氧梯度区间下 β -catenin的免疫荧光图像



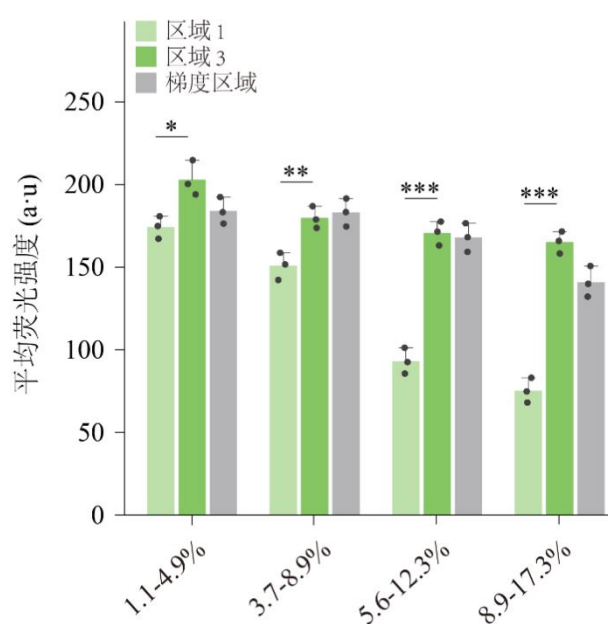
(b) β -catenin的平均荧光强度分析

图 4.10 不同氧气梯度区间下 β -catenin 蛋白的表达

ROS 通常会刺激促炎细胞因子的产生^[146]。鉴于氧梯度下炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β) 的增加, 检测了 ROS 在细胞内的表达 (图 4.11a)。通过免疫染色分析, ROS 的表达在区域和整体变化上呈现出与 hif-2 α 和 β -catenin 相类似的规律 (图 4.11b)。然而, 先前的研究结果表明氧气梯度并不直接导致 ROS 的增加^[147], 这暗示了 β -catenin 引发的脂质积累在调控 ROS 方面扮演着重要的角色。



(a)不同氧梯度区间下ROS的免疫荧光图像



(b)ROS的平均荧光强度分析

图 4.11 不同氧气梯度区间下 ROS 的表达

通过以上的免疫组化分析,总结了在肝小叶器官芯片中 NAFLD 干预机制(图 4.12)。在长期的非均匀缺氧条件下, $\text{hif-2}\alpha$ 的表达增加, 并且呈现出空间异质性。受 $\text{hif-2}\alpha$ 影响的 WNT 信号调控 $\beta\text{-catenin}$ 蛋白促进细胞对 FFAs 的吸收, 导致脂质生成增加。过量的脂质积累引发胞内 ROS 增多, 造成细胞氧化应激损伤。炎症因子 ($\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$) 的增多也侧面证实了这一点。当氧梯度区间增加时, $\text{hif-2}\alpha$ 、 $\beta\text{-catenin}$ 和 ROS 相应下调, 进而促使损伤的减少。这项发现为治疗 NAFLD 以及 NASH 提供新的见解。

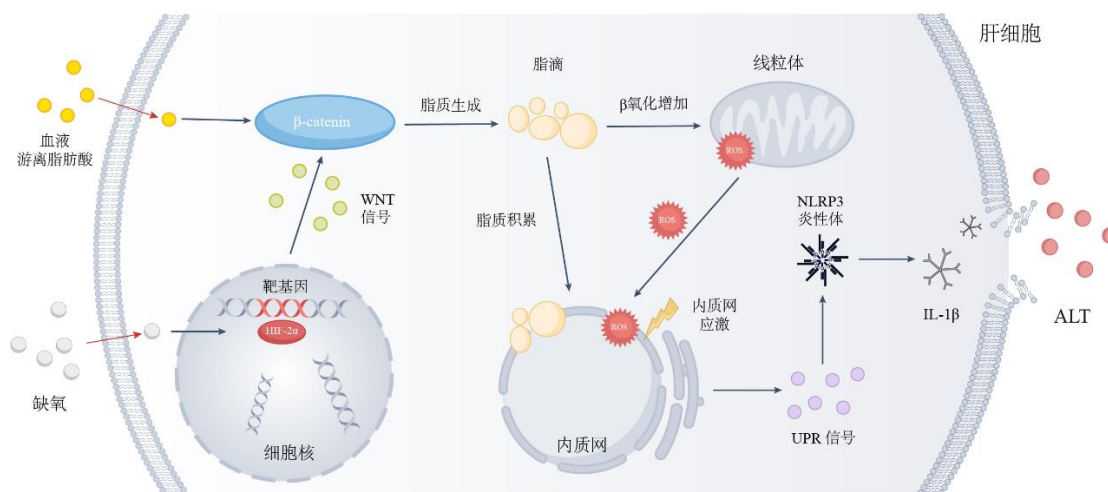


图 4.12 氧气梯度对 NAFLD 的干预机制概述

4.4 本章小结

本章节中，主要描述了谷丙转氨酶（ALT）传感器的集成以及 NAFLD 干预机制的探究。制备的三金电极传感器通过修饰 AuNPs 提高了检测能力，灵敏度为 $0.9423 \text{ nA min}^{-1} / \text{U L}^{-1}$ ，检测下限为 1.48 U/L 。同时具有良好的一致性和稳定性。随后，通过对 NAFLD 模型下细胞释放 ALT 的动态监测，发现在氧梯度环境比传统静态环境受到更强的细胞损伤，第 168 小时芯片内的细胞损伤是静态培养的 4.67 倍。此外，随着芯片内氧梯度区间的增加（1.1%-4.9%，3.7%-8.9%，5.6%-12.3%，8.9%-17.3%），缺氧诱导因子 hif-2 α 表达减少，减缓细胞间通讯蛋白（ β -catenin）的释放，降低线粒体活性氧（ROS）应激。通过集成的生物传感器监测，相应的细胞损伤生物标志物丙氨转氨酶（ALT）分泌减少。这些发现表明，在理解肝细胞分区的功能性影响以及如何干预 NAFLD 的疾病进程方面，氧气梯度模型至关重要。

第5章 仿生肠-肝器官芯片评估聚苯乙烯微塑料的转运、吸收和损伤

5.1 引言

近年来,塑料污染已经成为全球范围内环境和人类健康问题的主题^[148]。随着塑料废弃物数量不断增加,其持久性和有限的可逆性使其成为全球性威胁^[149]。特别是,微塑料(MPs),其尺寸范围从 0.1 μm 到 5 μm 不等^[150],广泛分布于各种自然环境、生物体和人类居住区^[151-154]。口服摄入是人类摄入 MPs 的主要途径之一,每年估计每人口服 MP 颗粒物的数量介于 39,000 至 52,000 个之间^[155],并预计随时间增加。最近的研究表明,MPs 能够渗透到肺部^[156]、肠道^[157]、胎盘^[158]、肝脏^[159]、睾丸^[160]和血液^[161],诱导氧化应激、能量平衡/失衡、代谢紊乱和神经毒性^[150,162,163]。其中肠道和肝脏分别被认为是摄取和中毒的重要靶器官^{[164][165]}。口服摄入的微塑料经过肠道上皮运输并被吸收到血液中,然后第一个与肝脏接触^[166]。因此,迫切需要了解微塑料对这两个器官的潜在影响。

目前,评估 MPs 对于肠/肝毒性的方法主要依赖于体内动物模型和体外二维(2D)静态模型^[167,168]。在鸡模型中研究了摄入微塑料之后的生理状态^[169]。连续六周暴露于 5 μm PS-MP 中导致肠道紧密连接蛋白降低,有害的细菌和代谢物通过肠肝轴转移到肝脏,促使肝脏脂质代谢紊乱和细胞凋亡。然而,动物模型由于固有的物种差异,这些结果无法全面解释微塑料对人体器官的影响。传统的 2D 静态模型发现,250nm 的聚乳酸在穿过 Caco-2 细胞后,颗粒明显摄取到 HepG2 细胞中,并引起外源性代谢的改变^[170]。这也表明肠道和肝脏之间的关联确实在 MPS 毒性中起着重要作用。然而,2D 体外培养未能有效模拟人类生理的许多关键特征,包括肠道的绒毛分化、粘液产生^[171],以及肝脏流动的血液环境^[172]。这些特征在调节纳米颗粒毒性方面至关重要。

传统的体外模型无法再现人体独特的生理微环境特征,因此无法预测微塑料在体内的复杂反应。近年来,器官芯片依靠其对人体组织微环境的高度模拟(包括细胞外基质^[173]、几何形状^[174]、机械刚度^[175]和流量^[176]),为研究纳米颗粒的毒性影响提供了新的可能性。已开发了多种器官芯片模型用于探究纳米颗粒造成的损伤^[177-181]。然而,这些模型大多仅针对单一靶器官进行研究,缺少详细的多器官暴露过程,特别是微塑料在肠道和肝脏中的转运、吸收和损伤。

本章节中将肝器官芯片与肠器官芯片相结合,制备了一种具有仿生肠蠕动和肝脏动态流动环境的肠-肝器官芯片。该芯片能够在体外实现贴近在体的肠道循环蠕动(1%-5%)和剪切应力(0.002Pa)^[182],置于其中的 Caco-2 和 HepaRG 细胞成功分化出体内肠屏障

和肝组织特征。此外, 100nm 的聚苯乙烯 MPs 在肠道和肝脏之间循环灌注, 深入探究 MPs 经口服后在体内肠道的转运、吸收和损伤。

5.2 实验部分

5.2.1 肠-肝器官芯片检测微塑料的实验材料和设备

肠-肝器官芯片检测微塑料所使用的材料与设备如下表所示:

表 5.1 肠-肝器官芯片检测微塑料所使用的实验材料

材料名称	生产厂家	型号
William's E 培养基	美国 Gibco	12551032
高糖培养基 (DMEM)	美国 Gibco	C11995500BT
聚二甲基硅氧烷 (PDMS)	美国道康宁	184
聚碳酸酯滤膜 (PCTE)	北京赛福莱博科技	47-0.2-10
聚苯乙烯荧光微球	天津倍思乐	9003-53-6
F-actin mAb	美国 Abcam	ab130935
ZO-1 mAb	美国 Abcam	ab221547
Ezrin mAb	美国 Abcam	ab40839
CYP3A4 mAb	武汉爱博泰克	A22229
AlexaFluor 488	美国 Abcam	ab150113
AlexaFluor 647	美国 Abcam	ab150075
DAPI	大连美仑生物	MA0127
细胞活/死染色试剂	大连美仑生物	MA0361
人白蛋白 Elisa 试剂盒	武汉赛培生物	SP10526
人尿素 Elisa 试剂盒	武汉赛培生物	SP39102
ALT 试剂盒 (Elisa)	上海酶联生物	ML064266

表 5.2 肠-肝器官芯片检测微塑料所使用的实验设备

实验设备名称	生产厂家	型号
细胞培养箱	山东博科生物	QP-160
生物安全柜	山东博科生物	BSC-1100 II A2-x
离心机	苏州国飞实验室仪器	TDL-5A
恒温干燥箱	绍兴易诚仪器	101-00B
倒置显微镜	日本尼康	TS2R
共聚焦免疫荧光显微镜	日本尼康	Ti-2

续表 5.2 肠-肝器官芯片检测微塑料所使用的实验设备

实验设备名称	生产厂家	型号
蠕动泵	保定迪创电子	BT100LC/DG6
注射泵	保定迪创电子	LSP-02-1B
立式蒸汽灭菌器	江苏登冠医疗	DGL-35B
酶标仪	美国安捷伦	SynergyNeo

5.2.2 肠-肝器官芯片的制作

肠-肝器官芯片由聚二甲基硅氧烷（PDMS）制造。该芯片由两部分组成：具有上下双层灌流通道（宽 1.5mm×高 0.5mm）和两个真空室的肠腔，以及具有单层灌流通道（宽 2mm×高 0.5mm）的肝腔。肠腔上下两层之间由多孔膜（10 μm 厚；1 μm 孔径）进行分割，并经过一条串联通道（宽 1mm×高 0.5mm）与肝腔相连。将 PDMS 和固化剂以 10:1 的重量比混合搅拌均匀，充分去除气泡后倒入模具中。在 70℃ 固化 4h 后制成带有微通道的顶层和底层，并在顶部打孔用于培养基的输送。按照顶层、多孔膜和底层的顺序将三者使用氧等离子体键合 120s。最后，使用不锈钢细管（内径：0.8 mm；外径：1.0 mm）将芯片中的微通道与硅胶毛细管（内径：1.0 mm；外径：1.5 mm）连接起来。使用高精度蠕动泵控制流速并进行循环灌流。

5.2.3 微塑料颗粒的灌流

带有绿色荧光标记（488/518）的聚苯乙烯 MPs 颗粒购自上海阿拉丁（直径 100nm）。用超纯水将 MPs 分别稀释至 0.25mg/ml，0.5mg/ml，0.75mg/ml 和 1mg/ml 的浓度。在芯片细胞培养的第 5 天（细胞成熟期）加入培养基并循环灌流（500 μL/h）24 小时，随后进行细胞损伤和功能性检测。

5.2.4 Caco-2 和 HepaRG 细胞培养

人结肠腺癌细胞系 Caco-2 购自如耀生物科技有限公司（浙江，中国）。在添加 10% 胎牛血清，1% 青霉素-链霉素的高糖 Dulbecco 改良 Eagle 培养基（DMEM）中置于培养箱（37℃，5% CO₂）培养。所有实验均使用第 5 和第 10 代之间的 Caco-2 细胞。HepaRG 细胞的培养在前文中已有介绍。

5.2.5 肠-肝器官芯片内的细胞种植

按照 Caco-2 和 HepaRG 的先后顺序进行细胞种植。首先封堵下层通道的进出口，将含有大鼠 I 型胶原（5 mg/ml）的无血清 DMEM 溶液注射到培养层中，并在 37℃ 下孵育 2 小时，用于制作细胞负载的基质（ECM）。随后将消化完成的 Caco-2 细胞调整至 6×10^4 cells/cm² 的浓度，通过无菌注射器缓慢注入到肠腔的 ECM 表面上，随后封堵上层进出口。紧接着将同样消化完成的 HepaRG 细胞按照 1×10^5 cells/cm² 的浓度缓慢从下层

通道注入肝腔，并封堵进出口。将芯片置入 37℃、5%CO₂ 的培养箱中静置 4h，使细胞充分贴壁。随后使用蠕动泵以恒定的流速（500 μL/h，0.002Pa）在上下两层循环灌注培养基。

5.2.6 Caco-2 细胞的转运率检测

转运率的检测在单一培养的 Caco-2 模型中进行。对 4 组浓度（0.25mg/ml, 0.5mg/ml, 0.75mg/ml 和 1mg/ml）的 MPs 进行荧光强度定量。随后在上层循环灌注 4 组浓度的 MPs 24 小时，使细胞充分对 MPs 进行转运。收集下层的溶液并使用酶标仪进行荧光强度分析。

5.3 结果与讨论

5.3.1 肠-肝器官芯片的构建

MPs 是存在于各种环境中的污染物，可进入人体并在各器官中积聚，通过空气吸入和食物摄入造成危害。进入人体的 MPs 在经历肠道的转运后，肝脏也可以成为入侵的目标（图 5.1）。我们受肠肝轴的启发，设计了一款串联连接的肠-肝器官芯片，用于体外探究 MPs 经过肠道转运，在肝脏中吸收并造成损伤的过程。

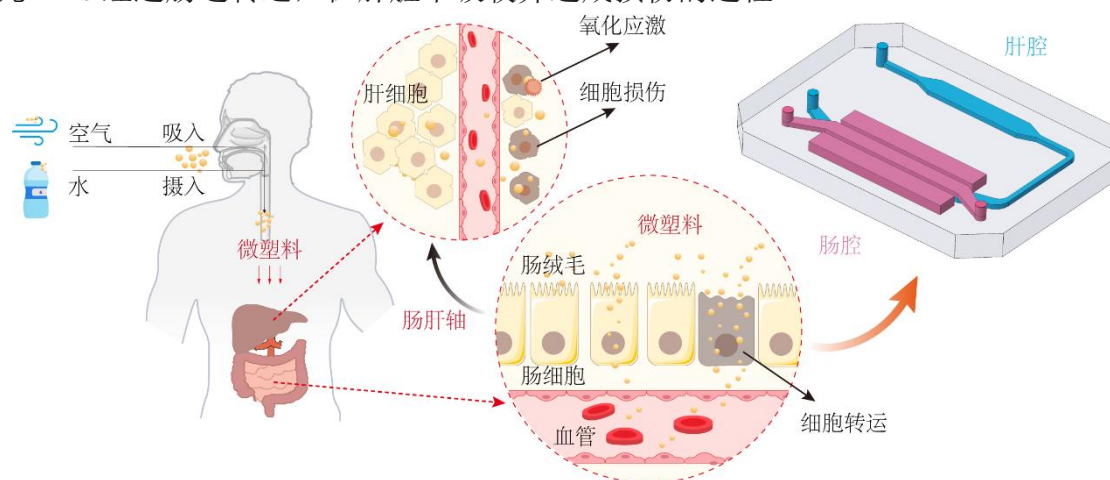


图 5.1 人体摄入微塑料（MPs）的示意图

芯片由两层 PDMS 组成，形成两个培养腔室（图 5.2a）：肠腔（芯片左侧，宽 1.5mm，高 0.5mm）和肝腔（芯片右侧，宽 2mm，高 0.5mm）。上层通道用于肠腔的循环灌流，模拟人体肠道受到的剪切应力。下层通道由微流体通道（宽 1mm，高 0.5mm）对肠腔和肝腔进行串联连接，并采用蠕动泵进行循环灌流。这种结构类似体内 MPs 颗粒经过肠道的转运，通过血液输送到肝脏的过程。肠腔上通道和下通道之间粘接一层薄而透明的聚碳酸酯（PC）多孔膜（厚 10μm，孔径 1μm），分隔肠腔和肝腔的同时，允许 MPs 扩散。Caco-2 细胞在膜上培养。通过在流体通道两侧的真空腔（宽 2mm，高 1mm）施加循环气压，带动多孔膜进行相应的循环拉伸，使 Caco-2 细胞还原类似在体的肠道蠕动变形。

图 5.2b 是芯片组装后的实物图。

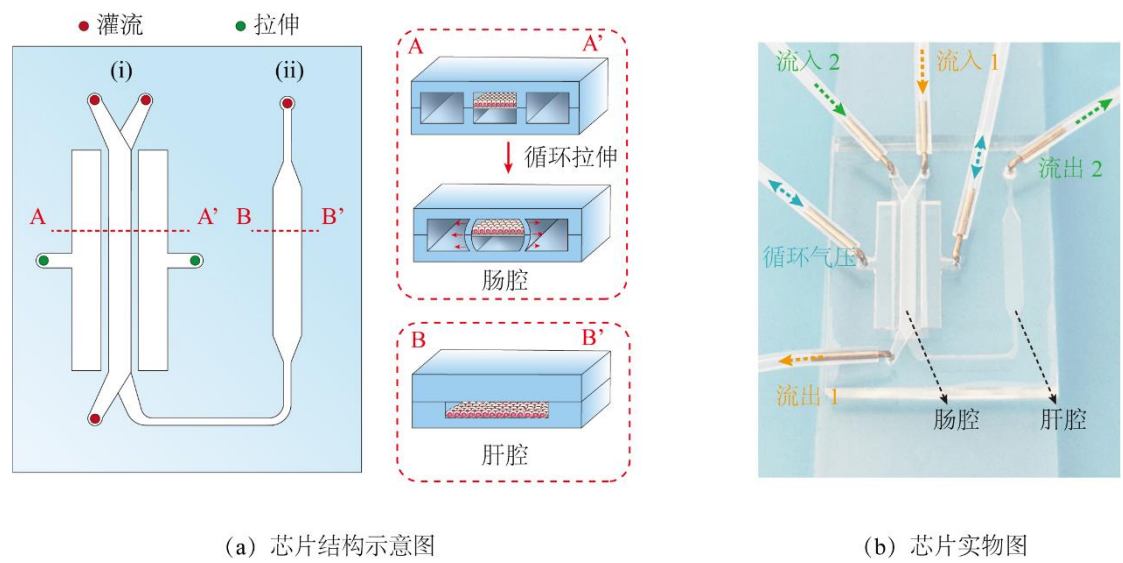


图 5.2 肠-肝器官芯片的构建及内部结构

5.3.2 肠-肝器官芯片灌流速度和循环气压确定

为了了解培养介质在芯片灌流通道内的流动状态，使用有限元分析软件（COMSOL Multiphysics 5.5 试用版），基于 Navier-Stokes 方程，对真实芯片尺寸的内部流体流动（图 5.3a）和剪切应力（图 5.3b）进行数值建模。通道内的流速分布呈现抛物线形态，符合层流运动规律。同时流动产生的剪切应力在通道壁面时达到最大值。鉴于细胞培养在通道底部，后续选取底部边缘处的剪切应力值作为细胞受到的剪切应力。

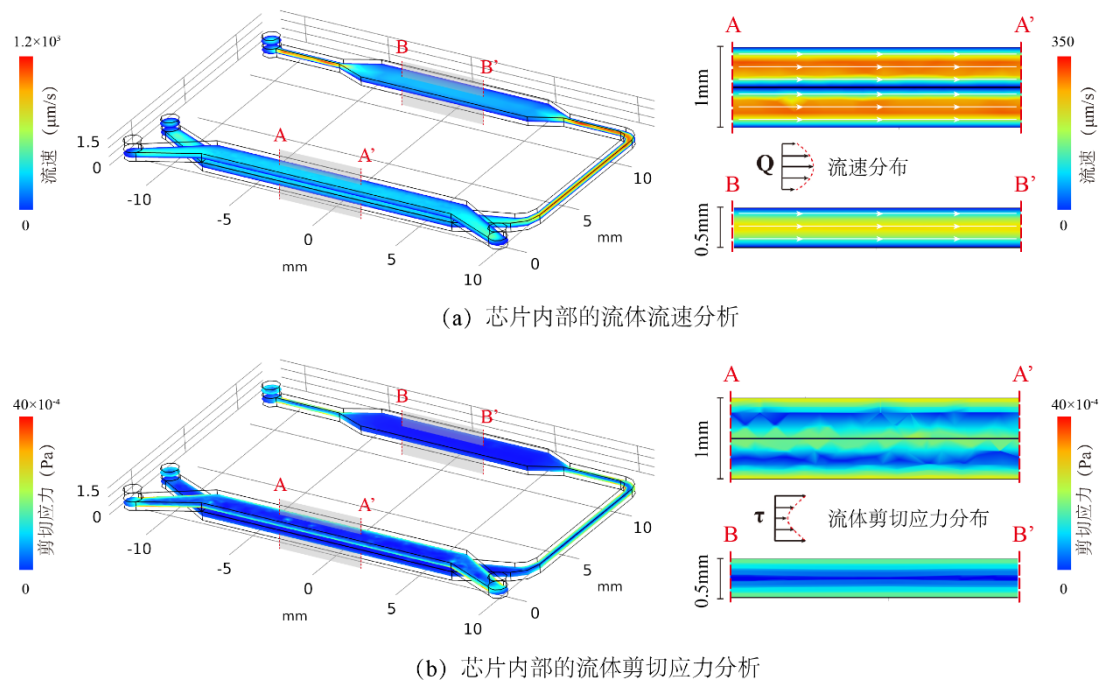


图 5.3 肠-肝器官芯片内部通道的流体有限元分析

为了进一步形成与体内相近的肠道剪切应力,通过仿真与实验相结合,探究了不同流速(100 $\mu\text{L/h}$ 到1000 $\mu\text{L/h}$)下细胞受到的剪切应力变化(图5.4a)。随着流速增加,细胞所受剪切应力呈线性增加趋势。当流速达到500 $\mu\text{L/h}$ 时,细胞受到的剪切应力达到0.002 Pa,贴近在体肠道细胞受到的剪切应力。鉴于肝细胞对剪切应力的敏感性,我们通过增加肝腔的宽度以减小流速及相应的剪切应力。图5.4b显示,当肠腔的平均线速度和剪切应力分别为165.05 $\mu\text{m/s}$ 和0.002Pa时,肝腔的平均线速度以及细胞受到的剪切应力为128.52 $\mu\text{m/s}$ 和0.0018Pa,远低于肝细胞的损伤阈值(0.1Pa)^[91]。

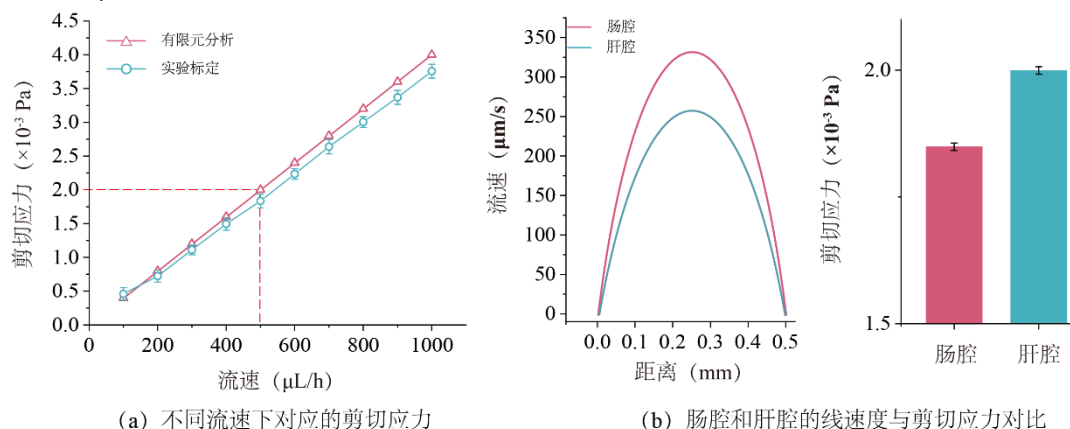


图 5.4 不同流速对应的细胞剪切应力

为了形成与体内相近的肠道蠕动运动,使用注射泵对肠腔周围的两个真空腔施加循环气压,并记录多孔膜的形变情况(图5.5)。在3-21 KPa的气压范围内,多孔膜的拉伸应变呈现线性变化,拟合曲线(红色虚线)为:拉伸应变(%)=0.290 气压(KPa)+0.104, $R^2=0.996$ 。根据先前的研究^[115],1%的拉伸应变可促进肠道上皮细胞的生长分化。因此,后续施加3KPa的循环气压构建肠道蠕动状态。

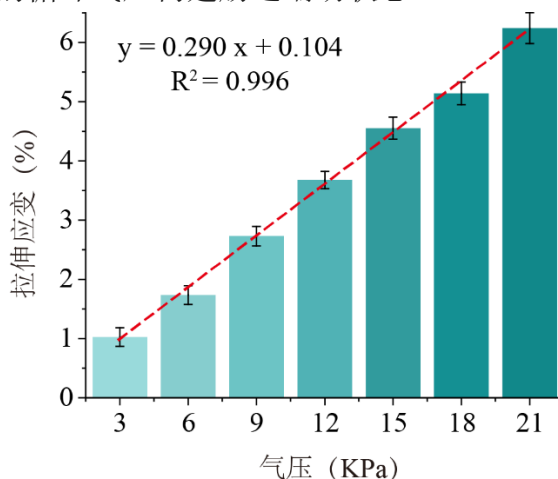


图 5.5 施加不同气压对应的多孔膜拉伸应变

5.3.3 肠-肝器官芯片重建肠道-肝脏微环境

为了探究剪切应力和拉伸应变对肠上皮细胞形貌和分化的影响,我们以500 $\mu\text{L/h}$ 的

流速（0.002 Pa）在芯片中进行循环灌流培养 Caco-2 细胞，并控制真空腔中的气压变化施加 1% 的拉伸应变。第 7 天的显微镜（明场）显示，在芯片和静态培养的细胞都贴壁良好（图 5.6a）。芯片内培养的细胞形貌呈现出褶皱样结构，类似于肠道绒毛，而静态培养的细胞形貌较为平坦。此外，使用免疫荧光显微镜分析了 ZO-1 蛋白（代表细胞紧密连接）和 Ezrin 蛋白（代表细胞分化程度）的表达。结果显示，与静态培养的细胞相比，芯片内培养的细胞 ZO-1 和 Ezrin 蛋白的表达分别高了 19.85% 和 197.82%（图 5.6b）。表明芯片内的细胞具有更完整的连接性和更强的分化。

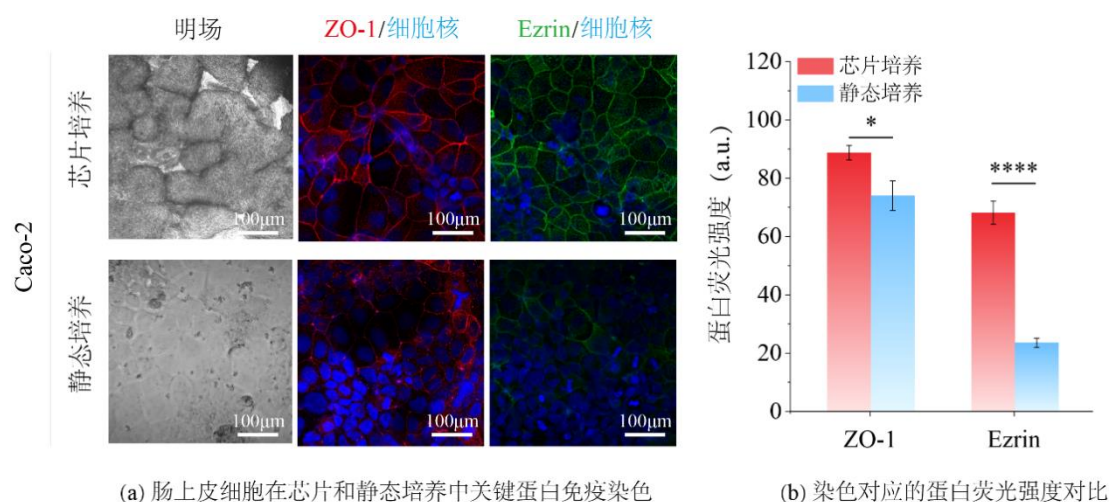


图 5.6 芯片和静态培养的肠上皮细胞形貌及功能对比

同样的，观察了在 390 μL/h 的流速（0.0018 Pa）循环灌流下 HepaRG 细胞的形貌和功能（图 5.7a）。第 7 天的明场图像显示，与静态培养相比，芯片内培养的 HepaRG 细胞呈现更强的团聚现象，类似 3D 组织样簇。此外，CYP3A4 酶（代表细胞代谢能力）和 F-actin 蛋白（代表细胞骨架）的表达分别比静态细胞高 99.45% 和 117.49%（图 5.7b）。

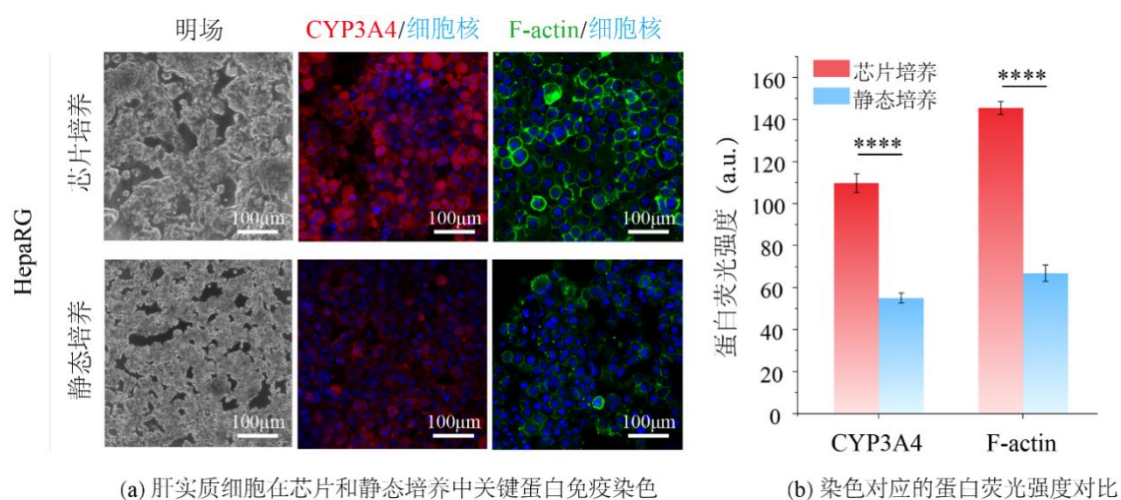


图 5.7 芯片和静态培养的肝实质细胞形貌及功能对比

为了进一步了解 Caco-2 细胞和 HepaRG 细胞的功能随时间的变化,连续 7 天分析了肠细胞屏障 TEER (图 5.8a) 和肝细胞白蛋白 (图 5.8b) 合成情况。静态和芯片内的 TEER 值都随时间上升,但芯片内的 TEER 值显著高于静态培养,第 7 天达到了静态培养的 3.62 倍 ($17.23\text{K}\Omega\cdot\text{cm}^2$ vs. $4.75\text{K}\Omega\cdot\text{cm}^2$)。值得注意的是,两者的 TEER 值在第 5 天达到峰值,随后下降,可能是因为肠细胞过度拥挤导致的损伤。同样的,芯片内肝细胞的白蛋白合成能力高于静态培养,第 7 天的白蛋白表达是静态的 1.47 倍 (71.48ng/h/million vs. 48.49ng/h/million)。此外,与静态培养相比,第 7 天芯片内的肠细胞 AKP 表达和肝细胞尿素代谢分别高了 3.68 倍和 2.59 倍 (图 5.8c)。综上可得,肠-肝器官芯片能促使细胞还原对应的肠道分化和肝脏代谢功能,为研究 MPs 的转运与吸收提供更好的平台。

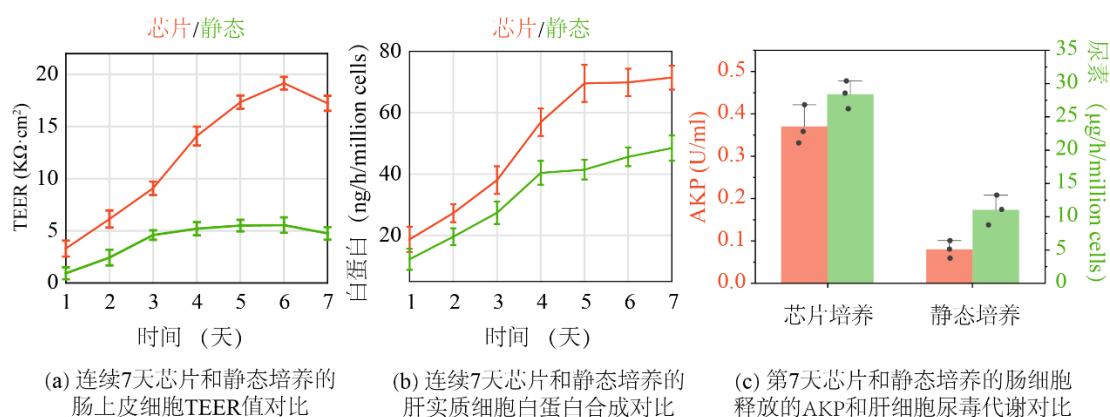


图 5.8 芯片和静态培养的肠-肝细胞功能随时间变化

5.3.4 微塑料在肠道中的摄取和肝脏损伤

肠粘膜是通过口腔途径吸收颗粒接触的第一道细胞屏障^[183]。为了了解 MPs 对肠道的影响 (包括细胞损伤,屏障完整性),我们分别将五组 MPs 浓度 (对照组, 0.25mg/ml , 0.5mg/ml , 0.75mg/ml 和 1mg/ml) 施加于 Caco-2 细胞,并在 24 小时后评估细胞存活率 (图 5.9a) 和 TEER 值 (图 5.9b)。结果显示,在 $0\text{--}1\text{mg/ml}$ 的浓度范围内, 100nm 的 MPs 对 Caco-2 细胞的活力和屏障完整性没有显著影响。细胞存活率均保持在 80% 以上, TEER 值维持在 $20\text{K}\Omega\cdot\text{cm}^2$ 附近,表明探究的浓度对细胞无毒。为了探究肠道对于 MPs 的转运,我们采用单一的肠细胞模型 (不添加肝细胞)。在上层施加 MPs 溶液循环灌流 24 小时后,收集下层的溶液,并使用免疫荧光显微镜定量 MPs 的荧光强度 (图 5.9c)。结果显示, 0.25mg/ml , 0.50mg/ml 和 0.75mg/ml 浓度的细胞转运率保持在 8% 左右。然而 1mg/ml 浓度的 MPs 转运率下降到 $6.4\%\pm0.4\%$,具有统计学意义 ($p < 0.05$)。这可能是由于细胞的转运量达到了饱和。

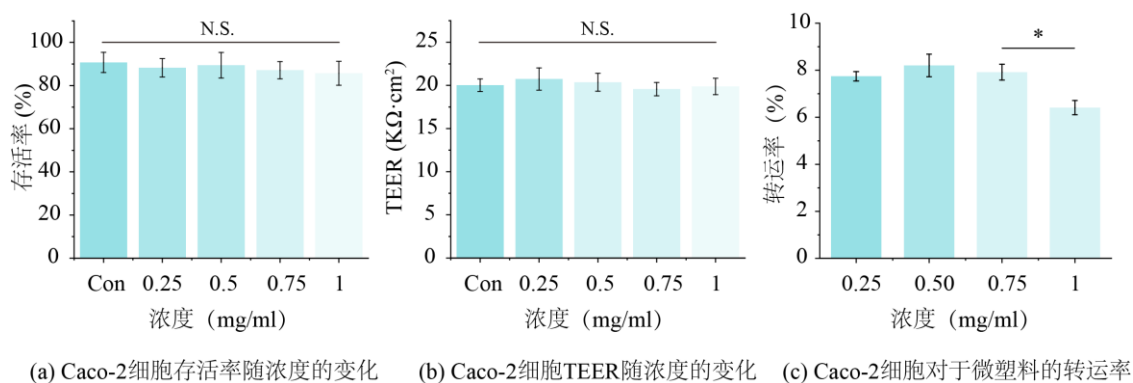


图 5.9 Caco-2 细胞和 MPs 共培养 24 小时后存活率、TEER 和转运率变化

在分析了 MPs 在肠上皮层的转运之后，我们将肠道单一培养模型与人肝细胞模型相结合，以解决转运颗粒是否能够到达肝细胞并被它们吸收的问题。MPs 溶液从肠腔上层循环灌注 24 小时后，对肝腔的细胞进行免疫染色分析。图 5.10a 的免疫荧光图显示了 MPs（绿色）渗入并均匀的分布在 HepaRG 细胞内。相比于 0.25mg/ml 浓度，0.50mg/ml 和 0.75mg/ml 浓度的 MPs 积累分别高了 144.84% 和 308.75%（图 5.10b）。值得注意的是，1mg/ml 浓度的 MPs 积累与 0.75mg/ml 浓度没有显著性差异，验证了前文关于细胞转运量达到饱和的猜测。为了了解 MPs 的积累是否会导致肝损伤，对 HepaRG 细胞的活力进行了评估（图 5.10c）。结果显示，在 0-0.5mg/ml 的浓度范围内，细胞保持良好的存活率（>80%）。然而当浓度增加到 0.75mg/ml 和 1mg/ml 时，存活率分别下降到 76.56% 和 66.11%。高剂量的 MPs 积累对肝细胞造成了损伤。

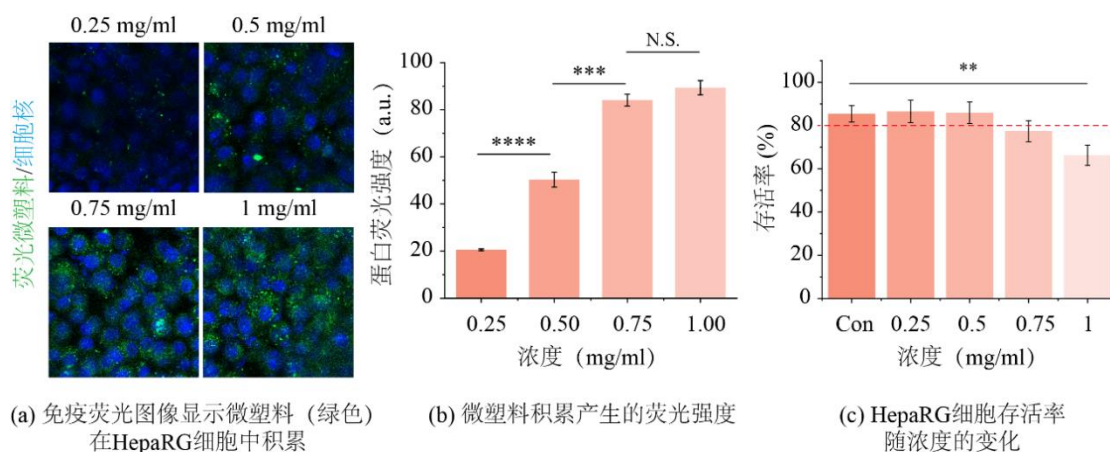


图 5.10 MPs 在 HepaRG 细胞中的积累和损伤影响

为了进一步探究肝细胞的损伤类型，对活性氧（ROS）以及肿瘤坏死因子（TNF- α ）的表达进行评估（图 5.11a）。ROS 是细胞代谢的产物，当生物体处于压力下时，会过量生成并导致氧化损伤。免疫荧光染色图像显示，ROS 的表达与 MPs 的积累呈现正相关（图 4g）。相较于 0.25mg/ml 浓度，0.50mg/ml 和 0.75mg/ml 浓度的 ROS 表达分别高了 52.47% 和 161.81%（图 5.11b）。此外，TNF- α 的表达呈现相同的趋势，最高浓度

(1mg/ml) 下的释放量是对照组的 1.76 倍 (图 5.11c)。以上结果表明, 1mg/ml 浓度内的 MPs 不会对肠道造成损伤, 但可以透过肠道屏障导致肝脏氧化应激损伤。

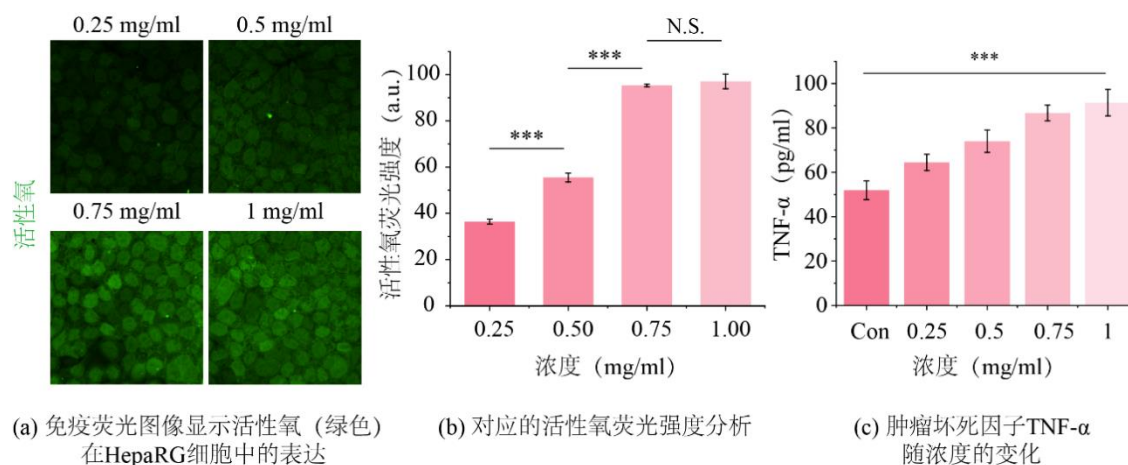


图 5.11 MPs 诱导下 HepaRG 细胞 ROS 和 TNF- α 的表达

5.3.5 肠道蠕动对于肝损伤的保护作用

谷丙转氨酶 (ALT) 是肝细胞的特异性损伤标志物。为了探究肠道蠕动对肝脏损伤的影响在 MPs 诱导下, 我们评估了在不同拉伸应变 (0%, 1%, 3%, 5%) 下 HepaRG 细胞的 ALT 释放 (图 5.12a)。使用 1mg/ml 的 MPs 溶液在肠腔循环灌注, 并在 24 小时后检测。结果显示, ALT 的释放随着拉伸应变的提高逐渐降低。相较于 0% 的拉伸应变, 1%、3% 和 5% 的 ALT 释放量分别降低了 39.19%、55.67% 和 71.79%。

为了进一步探究损伤变化背后的原因, 我们首先检测了 MPs 第一道屏障 (肠上皮细胞) 的 TEER 和转运率。相较于 0% 的拉伸应变, 1%、3% 和 5% 的 TEER 的值分别提高了 271.14%, 346.41% 和 410.21% (图 5.12b)。表明拉伸应变的提高增强了肠屏障功能。相反, 相较于 0% 的拉伸应变, 1%、3% 和 5% 的转运率分别下降了 46.69%, 57.28% 和 64.54% (图 5.12c)。意味着穿透到下层的 MPs 变少。

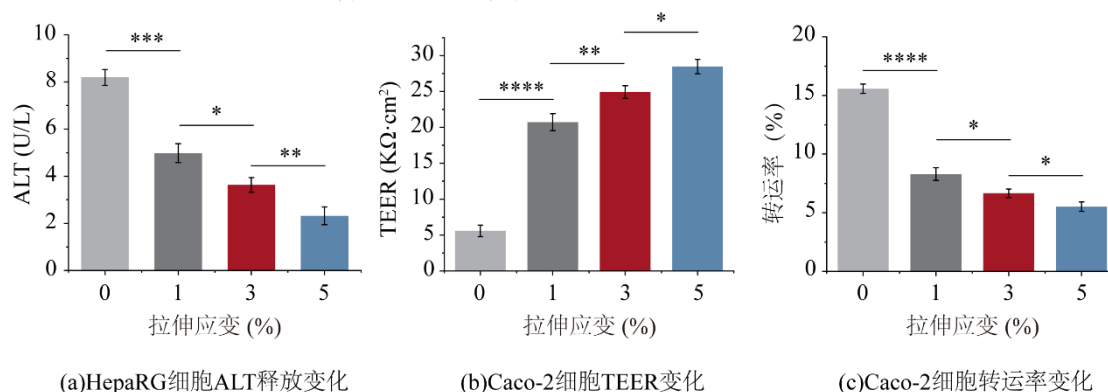


图 5.12 不同拉伸应变下细胞转运和损伤变化

最后, 我们进一步分析了肝细胞 MPs 的吸收和活性氧的表达 (图 5.13)。免疫染色结果显示, 两者的表达随着拉伸应变的增加而下降。相较于 0% 的拉伸应变, 对于 1%、

3%和5%的拉伸应变，细胞 MPs 的吸收分别降低了 28.04%，37.36%和 52.55%，相应的 ROS 表达分别降低了 20.03%，50.55%和 63.06%。因此，在一定范围内提高肠道蠕动可以促进肠道屏障的形成，并有助于减少 MPs 的转运。

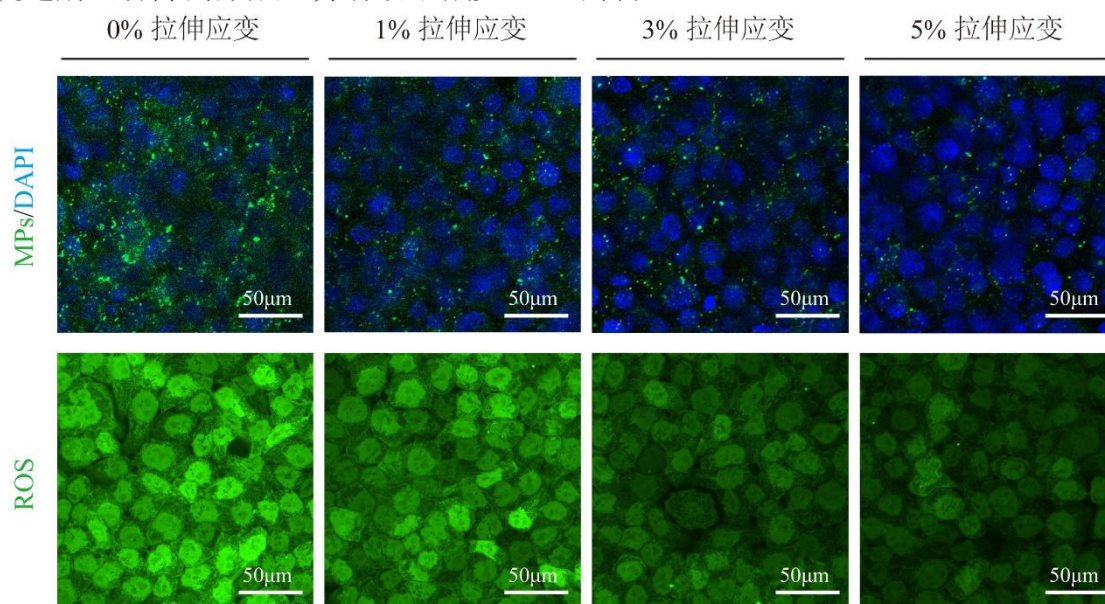


图 5.13 不同拉伸应变下细胞 MPs 吸收和 ROS 荧光图像

5.4 本章小结

在本章节中，开发了一种具有仿生肠道蠕动和肝脏动态流动环境的肠-肝器官芯片。通过荧光可视化和免疫组织化学方法，探究了 MPs 经口服后在人体肠道中的转运和肝脏的积累。与常规的共培养平台相比，该芯片可以还原体内肠道和肝脏的关键物理微环境，如肠道中的剪切应力（0.002Pa）和循环蠕动（1%-5%），以及肝脏中的血液流动。成功演化了肠道和肝脏各自的生理特征，如肠道的屏障功能和绒毛结构，以及肝脏的 3D 组织簇和代谢功能。此外，在肠腔和肝腔循环灌注了直径为 100nm 的聚苯乙烯 MPs 颗粒（浓度范围为 0-1 mg/ml），发现了随着肠道蠕动的增加（0%，1%，3%，5%），MPs 的转运率下降（≤8%），同时肝细胞的氧化应激和损伤程度相应下调。我们的肠-肝器官芯片展示了 MPs 经口服后在肠道的转运和肝脏吸收的过程，强调了肠道蠕动对保护肝脏免受损伤的重要作用，为评估 MPs 对不同器官的特异性影响提供了新的研究平台。

第6章 总结与展望

6.1 总结

为了构建贴近在体氧浓度梯度微环境的肝分区器官芯片,本文首先通过环境氧对流扩散的仿真研究了灌流速率对氧气梯度区间形成的影响;在构建出生理氧浓度梯度后,探究了 HepaRG 在此环境下的细胞动力学,包括细胞形貌和功能;随后,在具有肝分区异质性功能的细胞上构建非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 模型,探究疾病的进展以及干预机制;最后,将肝器官芯片与肠器官芯片串联连接,体外探究了微塑料 (MPs) 在人体内的转运、吸收和损伤。具体研究结论如下:

(1) 基于环境氧对流扩散的数值模型,仿生肝窦开窗的血流动力学,构建了肝小叶器官芯片。同时在体外培养实现可控的、贴近在体的氧浓度梯度 (3.7%-8.9%), 成功分化出在体肝小叶分区特征 (形貌特征: 细胞骨架、高度, 功能特征: 蛋白合成、细胞代谢)。

(2) 在肝分区芯片上成功诱导建立 NAFLD 模型, 最初的脂质积累出现在区域 3 (低氧区域), 至区域 1 (高氧区) 呈现渐弱变化。在随后的几天内, 这种梯度变化逐渐消失。此外, 相比于我们设置的均匀 20% 氧气条件, 氧梯度条件下的细胞出现了更为显著的损伤。深入研究了损伤的根本原因, 发现了氧梯度区间与细胞损伤程度呈现负相关, 同时揭示了 Hif-2 α , β -catenin 和 ROS 在 NAFLD 干预机制中的作用。

(3) 将肝器官芯片与具有仿生肠道蠕动的肠器官芯片相结合, 还原了微塑料经口服后在肠道的转运和肝脏的吸收过程。发现 100nm 的微塑料 (MPs) 在 1mg/ml 的浓度内不会对肠细胞造成损伤, 同时保持 8% 的转运率。与之相反, 肝细胞会产生氧化应激反应和细胞损伤, 损伤程度与 MPs 剂量呈正相关。此外, 提高肠道蠕动可以降低微塑料的转运率, 同时肝细胞损伤相应下调。

6.2 展望

尽管本文对肝分区芯片进行了研究及应用, 并取得了一定的成果, 但仍存在一些不足之处, 在后续的工作中会继续优化。不足之处如下:

(1) 细胞类型。研究受到 HepaRG 细胞使用的限制, 具有基因突变, 且缺乏精准的人肝功能。鉴于在 NAFLD 中肝星状细胞, 肝窦内皮细胞, 库弗细胞对纤维化形成的促进作用, 未来仍需加入这几种细胞去探究细胞间的相互作用对疾病进程的影响。

(2) 芯片材料。本文使用的 PDMS 芯片材料虽然具有良好的透明性和可制作性,

但对于许多疏水性的小分子具有吸附性，例如候选药物、生物制剂等。这影响了结果的准确性。未来可对 PDMS 表面改性或者采用玻璃作为制造芯片的潜在替代方案。

（3）传感器的集成。本文仅集成了单一的电化学传感器进行动态监测，检测参数有限，可能会忽略某些参数导致结果判断不准确。后续工作中需集成多种传感器对芯片进行多参数、全方位的监测，有助于药物筛选和疾病建模结果的准确性。

参考文献

- [1] Materne E M, Tonevitsky A G, Marx U. Chip-based liver equivalents for toxicity testing-organotypicalness versus cost-efficient high throughput[J]. Lab on a Chip, 2013, 13(18): 3481-3495.
- [2] LeCluyse E L, Witek R P, Andersen M E, et al. Organotypic liver culture models: Meeting current challenges in toxicity testing[J]. Critical Reviews in Toxicology, 2012, 42(6): 501-548.
- [3] Ho C T, Lin R Z, Chen R J, et al. Liver-cell patterning Lab Chip: Mimicking the morphology of liver lobule tissue[J]. Lab on a Chip, 2013, 13(18): 3578-3587.
- [4] McCuskey R S, Ekataksin W, LeBouton A V., et al. Hepatic Microvascular Development in Relation to the Morphogenesis of Hepatocellular Plates in Neonatal Rats[J]. Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology, 2003, 275(1): 1019-1030.
- [5] Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: A review[J]. Comparative Hepatology, 2002, 1: 1-17.
- [6] Godoy P, Hewitt N J, Albrecht U, et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME[J]. Archives of toxicology, 2013, 87: 1315-1530.
- [7] Andez A M H, Amenta P S. The extracellular matrix in hepatic regeneration[J]. The FASEB journal, 1995, 9(14): 1401-1410.
- [8] Zhou Q, Fan L, Li J. Liver Regeneration and Tissue Engineering[J]. Artificial Liver, 2021, 8(15): 73-94.
- [9] 李瑞阳, 王云之, 葛蕊, 等. 肝细胞体外培养去分化过程中转录因子表达谱分析[J]. 生物工程学报, 2018, 34(2): 294-302.
- [10] Lee B R, Hwang J W, Choi Y Y, et al. In situ formation and collagen-alginate composite encapsulation of pancreatic islet spheroids[J/OL]. Biomaterials, 2012, 33(3): 837-845. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.014>.
- [11] Williams D P, Shipley R, Ellis M J, et al. Novel in vitro and mathematical models for the prediction of chemical toxicity[J]. Toxicology Research, 2013, 2(1): 40-59.
- [12] Underhill G H, Khetani S R. Bioengineered Liver Models for Drug Testing and Cell Differentiation Studies[J]. Cmg, 2018, 5(3): 426-439.

- [13] Strain A J, Neuberger J M. A bioartificial liver - State of the art[J]. Science, 2002, 295(5557).
- [14] Gerlach J C, Mutig K, Sauer I M, et al. Use of primary human liver cells originating from discarded grafts in a bioreactor for liver support therapy and the prospects of culturing adult liver stem cells in bioreactors: A morphologic study[J]. Transplantation, 2003, 76(5): 781-786.
- [15] Tilles A W, Baskaran H, Roy P, et al. Effects of oxygenation and flow on the viability and function of rat hepatocytes cocultured in a microchannel flat-plate bioreactor[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2001, 73(5): 379-389.
- [16] Powers M J, Janigian D M, Wack K E, et al. Functional behavior of primary rat liver cells in a three-dimensional perfused microarray bioreactor[J]. Tissue Engineering, 2002, 8(3): 499-513.
- [17] Goral V N, Yuen P K. Microfluidic platforms for hepatocyte cell culture: New technologies and applications[J]. Annals of Biomedical Engineering, 2012, 40(6): 1244-1254.
- [18] 周钱, 郭茂泽, 郑青松, 等. 医用微流控芯片研究进展[J]. 中国科学: 化学, 2022, 52(1): 89-101.
- [19] Snouber L C, Bunescu A, Naudot M, et al. Metabolomics-on-a-chip of hepatotoxicity induced by anticancer drug flutamide and its active metabolite hydroxyflutamide using hepg2/c3a microfluidic biochips[J]. Toxicological Sciences, 2013, 132(1): 8-20.
- [20] Andersson H, Van Den Berg A. Microtechnologies and nanotechnologies for single-cell analysis[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2004, 15(1): 44-49.
- [21] 秦建华, 张敏, 于浩, 等. 人体器官芯片[J]. 中国科学院院刊, 2017, 32(12): 1281-1289.
- [22] 厉海笛, 陈晓萍. 仿生微流控肝芯片研究进展[J]. 中国生物医学工程学报, 2018, 37(5): 625-630.
- [23] 刘鑫磊, 林锐, 周晓冰, 等. 肝器官芯片研究进展[J]. 中国医药生物技术, 2022, 17(3): 245-249.
- [24] 黄恒顺, 邓九, 李晓瑞, 等. 微流控肠-肝-乳腺癌芯片的构建及其体外药物PK-PD分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 104-112.
- [25] Lee P J, Hung P J, Lee L P. An artificial liver sinusoid with a microfluidic endothelial-like barrier for primary hepatocyte culture[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, 97(5): 1340-1346.
- [26] Du Y, Li N, Yang H, et al. Mimicking liver sinusoidal structures and functions using a 3D-configured microfluidic chip[J]. Lab on a Chip, 2017, 17(5): 782-794.

- [27] Rennert K, Steinborn S, Gröger M, et al. A microfluidically perfused three dimensional human liver model[J]. *Biomaterials*, 2015, 71: 119-131.
- [28] Raasch M, Rennert K, Jahn T, et al. Microfluidically supported biochip design for culture of endothelial cell layers with improved perfusion conditions[J/OL]. *Biofabrication*, 2015, 7(1): 15013. <http://dx.doi.org/10.1088/1758-5090/7/1/015013>.
- [29] Banaeiyan A A, Theobald J, Paukštyte J, et al. Design and fabrication of a scalable liver-lobule-on-a-chip microphysiological platform[J]. *Biofabrication*, 2017, 9(1).
- [30] Ehrlich A, Duche D, Ouedraogo G, et al. Challenges and Opportunities in the Design of Liver-on-Chip Microdevices[J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2019, 21: 219-239.
- [31] Willekens F L A, Werre J M, Kruijt J K, et al. Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors[J]. *Blood*, 2005, 105(5): 2141-2145.
- [32] Leite S B, Roosens T, El Taghdouini A, et al. Novel human hepatic organoid model enables testing of drug-induced liver fibrosis in vitro[J/OL]. *Biomaterials*, 2016, 78: 1-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.11.026>.
- [33] Lecouter J, Moritz D R, Li B, et al. Angiogenesis-Independent Endothelial Protection of Liver : Role of VEGFR-1[J]. *Science*, 2003, 299(5608): 890-893.
- [34] Kidambi S, Sheng L, Yarmush M L, et al. Patterned co-culture of primary hepatocytes and fibroblasts using polyelectrolyte multilayer templates[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2007, 7(3): 344-353.
- [35] Yamato M, Kwon O H, Hirose M, et al. Novel patterned cell coculture utilizing thermally responsive grafted polymer surfaces[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2001, 55(1): 137-140.
- [36] Maher S P, Crouse R B, Conway A J, et al. Microphysical space of a liver sinusoid device enables simplified long-term maintenance of chimeric mouse-expanded human hepatocytes[J]. *Biomedical Microdevices*, 2014, 16(5): 727-736.
- [37] Prodanov L, Jindal R, Bale S S, et al. Long-term maintenance of a microfluidic 3D human liver sinusoid[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(1): 241-246.
- [38] Deng J, Zhang X, Chen Z, et al. A cell lines derived microfluidic liver model for investigation of hepatotoxicity induced by drug-drug interaction[J]. *Biomicrofluidics*, 2019, 13(2): 1-10.
- [39] Allen J W, Bhatia S N. Formation of steady-state oxygen gradients in vitro: Application to liver zonation[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 82(3): 253-262.

- [40] Lemasters J J, Caldwell-Kenkel J C, Gao W, et al. Hypoxic, ischemic, and reperfusion injury to liver[J]. *The liver: biology and pathobiology*, 2001, 1(1): 258-279.
- [41] Tonon F, Giobbe G G, Zambon A, et al. In vitro metabolic zonation through oxygen gradient on a chip[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 1-10.
- [42] Kang Y B, Eo J, Bulutoglu B, et al. Progressive hypoxia-on-a-chip: An in vitro oxygen gradient model for capturing the effects of hypoxia on primary hepatocytes in health and disease[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(3): 763-775.
- [43] Kang Y B, Eo J, Mert S, et al. Metabolic patterning on a chip: towards in vitro liver zonation of primary rat and human hepatocytes[J]. *Scientific reports*, 2018, 8(1): 8951.
- [44] Tanaka Y, Yamato M, Okano T, et al. Evaluation of effects of shear stress on hepatocytes by a microchip-based system[J]. *Measurement Science and Technology*, 2006, 17(12): 3167-3170.
- [45] Kidambi S, Yarmush R S, Novik E, et al. Oxygen-mediated enhancement of primary hepatocyte metabolism, functional polarization, gene expression, and drug clearance[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(37): 15714-15719.
- [46] Khetani S R, Bhatia S N. Microscale culture of human liver cells for drug development[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(1): 120-126.
- [47] Jang K J, Otieno M A, Ronxhi J, et al. Reproducing human and cross-species drug toxicities using a Liver-Chip[J]. *Science Translational Medicine*, 2019, 11(517).
- [48] Kostadinova R, Boess F, Applegate D, et al. A long-term three dimensional liver co-culture system for improved prediction of clinically relevant drug-induced hepatotoxicity[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2013, 268(1): 1-16.
- [49] Messner S, Agarkova I, Moritz W, et al. Multi-cell type human liver microtissues for hepatotoxicity testing[J]. *Archives of Toxicology*, 2013, 87(1): 209-213.
- [50] Verneti L A, Senutovitch N, Boltz R, et al. A human liver microphysiology platform for investigating physiology, drug safety, and disease models[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2016, 241(1): 101-114.
- [51] Underhill G H, Khetani S R. Emerging trends in modeling human liver disease in vitro[J]. *APL Bioengineering*, 2019, 3(4).
- [52] Veteläinen R, Van Vliet A, Gouma D J, et al. Steatosis as a risk factor in liver surgery[J]. *Annals of Surgery*, 2007, 245(1): 20-30.
- [53] Starley B Q, Calcagno C J, Harrison S A. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: A weighty connection[J]. *Hepatology*, 2010, 51(5): 1820-1832.

- [54] Gori M, Simonelli M C, Giannitelli S M, et al. Investigating nonalcoholic fatty liver disease in a liver-on-a-chip microfluidic device[J]. PLoS ONE, 2016, 11(7): 1-15.
- [55] Lee J, Choi B, No D Y, et al. A 3D alcoholic liver disease model on a chip[J]. Integrative Biology (United Kingdom), 2016, 8(3): 302-308.
- [56] Ortega-Prieto A M, Skelton J K, Wai S N, et al. 3D microfluidic liver cultures as a physiological preclinical tool for hepatitis B virus infection[J]. Nature Communications, 2018, 9(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-02969-8>.
- [57] Skardal A, Devarasetty M, Forsythe S, et al. A reductionist metastasis-on-a-chip platform for in vitro tumor progression modeling and drug screening[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2016, 113(9): 2020-2032.
- [58] 朱晶, 郭建军, 林俊辉, 等. 肝脏和小肠对药物首过代谢模型的研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2012, 17(8): 944-949.
- [59] Van Midwoud P M, Merema M T, Verpoorte E, et al. A microfluidic approach for in vitro assessment of interorgan interactions in drug metabolism using intestinal and liver slices[J]. Lab on a Chip, 2010, 10(20): 2778-2786.
- [60] Chen H J, Miller P, Shuler M L. A pumpless body-on-a-chip model using a primary culture of human intestinal cells and a 3D culture of liver cells[J]. Lab on a Chip, 2018, 18(14): 2036-2046.
- [61] Lee S Y, Sung J H. Gut–liver on a chip toward an in vitro model of hepatic steatosis[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(11): 2817-2827.
- [62] Tsamandouras N, Chen W L K, Edington C D, et al. Integrated Gut and Liver Microphysiological Systems for Quantitative In Vitro Pharmacokinetic Studies[J]. AAPS Journal, 2017, 19(5): 1499-1512.
- [63] Chen W L K, Edington C, Suter E, et al. Integrated gut/liver microphysiological systems elucidates inflammatory inter-tissue crosstalk[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2017, 114(11): 2648-2659.
- [64] Bricks T, Paullier P, Legendre A, et al. Development of a new microfluidic platform integrating co-cultures of intestinal and liver cell lines[J/OL]. Toxicology in Vitro, 2014, 28(5): 885-895. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2014.02.005>.
- [65] Esch M B, Mahler G J, Stokol T, et al. Body-on-a-chip simulation with gastrointestinal tract and liver tissues suggests that ingested nanoparticles have the potential to cause liver injury[J]. Lab on a Chip, 2014, 14(16): 3081-3092. 154.
- [66] Duan X, Zheng L, Zhang X, et al. A Membrane-free Liver-Gut-on-Chip Platform for the Assessment on Dysregulated Mechanisms of Cholesterol and Bile Acid Metabolism

- Induced by PM2.5[J]. ACS Sensors, 2020, 5(11): 3483-3492.
- [67] Mata A, Fleischman A J, Roy S. Characterization of Polydimethylsiloxane (PDMS) Properties for Biomedical Micro/Nanosystems[J]. Biomedical Microdevices, 2005, 7(4): 281-293.
- [68] Gomez-Sjoberg R, Leyrat A A, Houseman B T, et al. Biocompatibility and reduced drug absorption of sol-gel-treated poly(dimethyl siloxane) for microfluidic cell culture applications[J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(21): 8954-8960.
- [69] Toepke M W, Beebe D J. PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications[J]. Lab on a Chip, 2006, 6(12): 1484-1486.
- [70] Wang J D, Douville N J, Takayama S, et al. Quantitative analysis of molecular absorption into PDMS microfluidic channels[J]. Annals of Biomedical Engineering, 2012, 40(9): 1862-1873.
- [71] Domansky K, Sliz J D, Wen N, et al. SEBS elastomers for fabrication of microfluidic devices with reduced drug absorption by injection molding and extrusion[J]. Microfluidics and Nanofluidics, 2017, 21(6): 1-12.
- [72] Mark J. Mondrinos. Native extracellular matrix-derived semipermeable, optically transparent, and inexpensive membrane inserts for microfluidic cell culture[M]. Lab on a Chip, 2017.
- [73] Sun H, Chow E C Y, Liu S, et al. The Caco-2 cell monolayer: Usefulness and limitations[J]. Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology, 2008, 4(4): 395-411.
- [74] Wikswo J P, Block F E, Cliffl D E, et al. Engineering challenges for instrumenting and controlling integrated organ-on-chip systems[J]. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 2013, 60(3): 682-690.
- [75] Low L A, Mummery C, Berridge B R, et al. Organs-on-chips: into the next decade[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2021, 20(5): 345-361.
- [76] Zhang B, Korolj A, Lai B F L, et al. Advances in organ-on-a-chip engineering[J]. Nature Reviews Materials, 2018, 3(8): 257-278.
- [77] Caplin J D, Granados N G, James M R, et al. Microfluidic organ - on - a - chip technology for advancement of drug development and toxicology[J]. Advanced healthcare materials, 2015, 4(10): 1426-1450.
- [78] Ma C, Peng Y, Li H, et al. Trends in Pharmacological Sciences Organ-on-a-Chip : A New Paradigm for Drug Development[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2021, 42(2): 119-133.
- [79] Ho C T, Lin R Z, Chen R J, et al. Liver-cell patterning lab chip: mimicking the morphology

- of liver lobule tissue[J]. *Lab on a Chip*, 2013, 13(18): 3578-3587.
- [80] Du K, Li S, Li C, et al. Modeling nonalcoholic fatty liver disease on a liver lobule chip with dual blood supply[J]. *Acta Biomaterialia*, 2021, 134: 228-239.
- [81] Ben-Moshe S, Itzkovitz S. Spatial heterogeneity in the mammalian liver[J]. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 2019, 16(7): 395-410.
- [82] 张海博, 顾辰杰, 张瑞婧, 等. 肝脏代谢分区研究进展[J]. *生理科学进展*, 2022, 53(6): 447-451.
- [83] Li X, George S M, Verneti L, et al. A glass-based, continuously zonated and vascularized human liver acinus microphysiological system (vLAMPS) designed for experimental modeling of diseases and ADME/TOX[J/OL]. *Lab on a Chip*, 2018, 18(17): 2614-2631. <http://dx.doi.org/10.1039/C8LC00418H>.
- [84] Matsumura T, Thurman R G. Measuring rates of O₂ uptake in periportal and pericentral regions of liver lobule: Stop-flow experiments with perfused liver[J]. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 1983, 244(6): G656-G659.
- [85] Kim J Y, Han Y, Jeon B G, et al. Development of albumin monitoring system with hepatic hypoxia-on-a-chip[J]. *Talanta*, 2023, 260: 124592.
- [86] Liu Y, Ma Z, Zhao C, et al. HIF-1 α and HIF-2 α are critically involved in hypoxia-induced lipid accumulation in hepatocytes through reducing PGC-1 α -mediated fatty acid β -oxidation[J]. *Toxicology Letters*, 2014, 226(2): 117-123.
- [87] Lluís J M, Morales A, Blasco C, et al. Critical role of mitochondrial glutathione in the survival of hepatocytes during hypoxia[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(5): 3224-3232.
- [88] Legendre C, Hori T, Loyer P, et al. Drug-metabolising enzymes are down-regulated by hypoxia in differentiated human hepatoma HepaRG cells: HIF-1 α involvement in CYP3A4 repression[J/OL]. *European Journal of Cancer*, 2009, 45(16): 2882-2892. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2009.07.010>.
- [89] Ölander M, Wegler C, Flörkemeier I, et al. Hepatocyte size fractionation allows dissection of human liver zonation[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2021, 236(8): 5885-5894.
- [90] Jürgens G, Christensen H R, Brøsen K, et al. Acute hypoxia and cytochrome P450-mediated hepatic drug metabolism in humans[J]. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2002, 71(4): 214-220.
- [91] Lee-Montiel F T, George S M, Gough A H, et al. Control of oxygen tension recapitulates zone-specific functions in human liver microphysiology systems[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2017, 242(16): 1617-1632.

- [92] Kang Y B A, Eo J, Mert S, et al. Metabolic Patterning on a Chip: Towards in vitro Liver Zonation of Primary Rat and Human Hepatocytes[J/OL]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 1-13. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-27179-6>.
- [93] Ghafoory S, Stengl C, Kopany S, et al. Oxygen Gradient Induced in Microfluidic Chips Can Be Used as a Model for Liver Zonation[J]. Cells, 2022, 11(23): 1-14.
- [94] Moya A, Ortega-Ribera M, Guimerà X, et al. Online oxygen monitoring using integrated inkjet-printed sensors in a liver-on-a-chip system[J]. Lab on a Chip, 2018, 18(14): 2023-2035.
- [95] Jungermann K, Kietzmann T. Oxygen: Modulator of metabolic zonation and disease of the liver[J]. Hepatology, 2000, 31(2): 255-260.
- [96] Bulutoglu B, Rey-Bedón C, Kang Y B, et al. A microfluidic patterned model of non-alcoholic fatty liver disease: Applications to disease progression and zonation[J]. Lab on a Chip, 2019, 19(18): 3022-3031.
- [97] Niknahad H, O'Brien P J. Mechanism of sulfite cytotoxicity in isolated rat hepatocytes[J]. Chemico-Biological Interactions, 2008, 174(3): 147-154.
- [98] Shin W, Wu A, Massidda M W, et al. A robust longitudinal co-culture of obligate anaerobic gut microbiome with human intestinal epithelium in an anoxic-oxic interface-on-a-chip[J]. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 2019, 7: 13.
- [99] Teranaka S, Ishii T, Matsunaga Y, et al. Skeletonization of renal cysts of autosomal dominant polycystic kidney disease using magnetic resonance imaging[J]. Journal of Medical Imaging and Health Informatics, 2017, 7(3): 568-573.
- [100] Newby D, Marks L, Lyall F. Dissolved oxygen concentration in culture medium: Assumptions and pitfalls[J]. Placenta, 2005, 26(4): 353-357.
- [101] Leterrier Y. Durability of nanosized oxygen-barrier coatings on polymers[J]. Progress in Materials Science, 2003, 48(1): 1-55.
- [102] Grant J, Lee E, Almeida M, et al. Establishment of physiologically relevant oxygen gradients in microfluidic organ chips[J]. Lab on a Chip, 2022, 22(8): 1584-1593.
- [103] Kietzmann T. Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited[J]. Redox biology, 2017, 11: 622-630.
- [104] Malarkey D E, Johnson K, Ryan L, et al. New Insights into Functional Aspects of Liver Morphology[J]. Toxicologic Pathology, 2005, 33(1): 27-34.
- [105] Chang K S, Hsu W L, Chen H Y, et al. Determination of glutamate pyruvate transaminase activity in clinical specimens using a biosensor composed of immobilized L-glutamate oxidase in a photo-crosslinkable polymer membrane on a palladium-deposited screen-

- printed carbon electrode[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 481(2): 199-208.
- [106] Paris J, Henderson N C. Liver zonation, revisited[J]. *Hepatology*, 2022, 76(4): 1219-1230.
- [107] Cox M E, Dunn B. Oxygen diffusion in poly(dimethyl siloxane) using fluorescence quenching. II. Filled samples[J]. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 1986, 24(10): 2395-2400.
- [108] Rashidi H, Alhaque S, Szkolnicka D, et al. Fluid shear stress modulation of hepatocyte-like cell function[J]. *Archives of Toxicology*, 2016, 90(7): 1757-1761.
- [109] Wong V W S, Ekstedt M, Wong G L H, et al. Changing epidemiology, global trends and implications for outcomes of NAFLD[J/OL]. *Journal of Hepatology*, 2023, 79(3): 842-852. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.04.036>.
- [110] Ioannou G N. The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH[J]. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2016, 27(2): 84-95.
- [111] Fabbrini E, Mohammed B S, Magkos F, et al. Alterations in Adipose Tissue and Hepatic Lipid Kinetics in Obese Men and Women With Nonalcoholic Fatty Liver Disease[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(2): 424-431.
- [112] Hall Z, Bond N J, Ashmore T, et al. Lipid zonation and phospholipid remodeling in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatology*, 2017, 65(4): 1165-1180.
- [113] Martini T, Naef F, Tchorz J S. Spatiotemporal Metabolic Liver Zonation and Consequences on Pathophysiology[J]. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2023, 18: 439-466.
- [114] ELIAS H. Liver Morphology[J]. *Biological Reviews*, 1955, 30(3): 263-310.
- [115] Wang L, Han J, Su W, et al. Gut-on-a-chip for exploring the transport mechanism of Hg(II)[J]. *Microsystems and Nanoengineering*, 2023, 9(1): 2.
- [116] Duivenvoorde L P M, Louisse J, Pinckaers N E T, et al. Comparison of gene expression and biotransformation activity of HepaRG cells under static and dynamic culture conditions[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 10327.
- [117] Jungermann K, Katz N. Functional specialization of different hepatocyte populations[J]. *Physiological Reviews*, 1989, 69(3): 708-764.
- [118] Sasse D et al. Functional heterogeneity of rat liver parenchyma and of isolated hepatocytes[J]. *FEBS Lett*, 1975, 57(4): 83-88.
- [119] Jungermann K, Heilbronn R. The Glucose/Glucose-6-Phosphate Cycle in the Periportal and Perivenous Zone of Rat Liver[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1982, 123(2): 429-436.
- [120] Tiniakos D G, Vos M B, Brunt E M. Nonalcoholic fatty liver disease: Pathology and

- pathogenesis[J]. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2010, 5: 145-171.
- [121] Fuchs C D, Claudel T, Trauner M. Role of metabolic lipases and lipolytic metabolites in the pathogenesis of NAFLD[J/OL]. Trends in Endocrinology and Metabolism, 2014, 25(11): 576-585. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2014.08.001>.
- [122] Liu Q, Bengmark S, Qu S. The role of hepatic fat accumulation in pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. Lipids in Health and Disease, 2010, 9: 1-9.
- [123] Neuschwander-Tetri B A. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: The central role of nontriglyceride fatty acid metabolites[J]. Hepatology, 2010, 52(2): 774-788.
- [124] Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis E A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J/OL]. Metabolism: Clinical and Experimental, 2016, 65(8): 1038-1048. <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>.
- [125] Brunt E M, Wong V W S, Nobili V, et al. Nonalcoholic fatty liver disease[J]. Nature Reviews Disease Primers, 2015, 1(1): 1-22.
- [126] Hashimoto E, Tanai M, Tokushige K. Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH[J]. Journal of gastroenterology and hepatology, 2013, 28: 64-70.
- [127] Yang J, Hirai Y, Iida K, et al. Integrated-gut-liver-on-a-chip platform as an in vitro human model of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Communications Biology, 2023, 6(1): 1-14.
- [128] Li X X, Lu X Y, Zhang S J, et al. Sodium tanshinone IIA sulfonate ameliorates hepatic steatosis by inhibiting lipogenesis and inflammation[J]. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2019, 111: 68-75.
- [129] Gómez-Lechón M J, Donato M T, Martínez-Romero A, et al. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis[J]. Chemico-Biological Interactions, 2007, 165(2): 106-116.
- [130] Tandra S, Yeh M M, Brunt E M, et al. Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease[J/OL]. Journal of Hepatology, 2011, 55(3): 654-659. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2010.11.021>.
- [131] Yeh M M, Brunt E M. Pathological features of fatty liver disease[J]. Gastroenterology, 2014, 147(4): 754-764. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.07.056>.
- [132] Fisher C D, Lickteig A J, Augustine L M, et al. Hepatic cytochrome P450 enzyme alterations in humans with progressive stages of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Drug Metabolism and Disposition, 2009, 37(10): 2087-2094.

- [133] Taseer I U H, Hussain L, Safdar S, et al. Frequency of non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its biochemical derangements in type-2 diabetic patients[J]. Pakistan Journal of Medical Sciences, 2009, 25(5): 817-820.
- [134] Ozer J, Ratner M, Shaw M, et al. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity[J]. 2008, 245: 194-205.
- [135] Kew M C. Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage[J]. Lancet, 2000, 355(9204): 591-592.
- [136] La Cour J B, Generelli S, Barbe L, et al. Low-cost disposable ALT electrochemical microsensors for in-vitro hepatotoxic assessment[J/OL]. Sensors and Actuators, B: Chemical, 2016, 228: 360-365. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.008>.
- [137] 古宗利,赵继宽,刘树峰. 电化学生物传感器在检测癌症标志物中的应用进展[J]. 山东化工, 2022, 51(17): 135-138.
- [138] Amacher D E. Serum transaminase elevations as indicators of hepatic injury following the administration of drugs[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 1998, 27(2): 119-130.
- [139] Mridha A R, Wree A, Robertson A A B, et al. NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice[J/OL]. Journal of Hepatology, 2017, 66(5): 1037-1046. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2017.01.022>.
- [140] Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, et al. Gene expression of tumor necrosis factor α and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients[J]. Hepatology, 2001, 34(6): 1158-1163.
- [141] Xie C, Yagai T, Luo Y, et al. Activation of intestinal hypoxia-inducible factor 2 α during obesity contributes to hepatic steatosis[J]. Nature Medicine, 2017, 23(11): 1298-1308.
- [142] Perugorria M J, Olaizola P, Labiano I, et al. Wnt- β -catenin signalling in liver development, health and disease[J]. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, 2019, 16(2): 121-136.
- [143] Ma C, Kesarwala A H, Eggert T, et al. NAFLD causes selective CD4⁺ T lymphocyte loss and promotes hepatocarcinogenesis[J/OL]. Nature, 2016, 531(7593): 253-257. <http://dx.doi.org/10.1038/nature16969>.
- [144] Uchida T, Rossignol F, Matthay M A, et al. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α expression in lung epithelial cells: Implication of natural antisense HIF-1 α [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(15): 14871-14878.
- [145] Bagchi D P, Nishii A, Li Z, et al. Wnt/ β -catenin signaling regulates adipose tissue

- lipogenesis and adipocyte-specific loss is rigorously defended by neighboring stromal-vascular cells[J]. *Molecular metabolism*, 2020, 42: 101078.
- [146] Sorbara M T, Girardin S E. Mitochondrial ROS fuel the inflammasome[J]. *Cell Research*, 2011, 21(4): 558-560.
- [147] Sgarbi G, Gorini G, Costanzini A, et al. Hypoxia decreases ROS level in human fibroblasts[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2017, 88: 133-144.
- [148] Persson L, Carney Almroth B M, Collins C D, et al. Outside the Safe Operating Space of the Planetary Boundary for Novel Entities[J]. *Environmental Science and Technology*, 2022, 56(3): 1510-1521.
- [149] MacLeod M, Arp H P H, Tekman M B, et al. The global threat from plastic pollution[J]. *Science*, 2021, 373(6550): 61-65.
- [150] Jing J, Zhang L, Han L, et al. Polystyrene micro-/nanoplastics induced hematopoietic damages via the crosstalk of gut microbiota, metabolites, and cytokines[J]. *Environment International*, 2022, 161: 107131.
- [151] Koutnik V S, Leonard J, Alkidim S, et al. Distribution of microplastics in soil and freshwater environments: Global analysis and framework for transport modeling[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 274: 116552.
- [152] Rodrigues S M, Almeida C M R, Silva D, et al. Microplastic contamination in an urban estuary: Abundance and distribution of microplastics and fish larvae in the Douro estuary[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 659: 1071-1081.
- [153] Qiu R, Song Y, Zhang X, et al. Microplastics in Urban Environments: Sources, Pathways, and Distribution[J]. *Handbook of Environmental Chemistry*, 2020, 95: 41-61.
- [154] 张国珍, 杨思益, 闵芮, 等. 我国城市地表水中微塑料特征、生态风险及来源分析[J]. *安全与环境学报*, 2024, 24(3): 1209-1222.
- [155] Cox K D, Covernton G A, Davies H L, et al. Human Consumption of Microplastics[J]. *Environmental Science and Technology*, 2019, 53(12): 7068-7074.
- [156] Jenner L C, Rotchell J M, Bennett R T, et al. Detection of microplastics in human lung tissue using μ FTIR spectroscopy[J]. *Science of The Total Environment*, 2022, 831: 154907.
- [157] Li B, Ding Y, Cheng X, et al. Polyethylene microplastics affect the distribution of gut microbiota and inflammation development in mice[J/OL]. *Chemosphere*, 2020, 244: 125492. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125492>.
- [158] Ragusa A, Svelato A, Santacroce C, et al. Plasticenta: First evidence of microplastics in

- human placenta[J]. *Environment International*, 2021, 146: 106274.
- [159] Horvatits T, Tamminga M, Liu B, et al. Microplastics detected in cirrhotic liver tissue[J]. *eBioMedicine*, 2022, 82: 1-10.
- [160] Zhao Q, Zhu L, Weng J, et al. Detection and characterization of microplastics in the human testis and semen[J]. *Science of The Total Environment*, 2023, 877: 162713.
- [161] Çobanoğlu H, Belivermiş M, Sıkdokur E, et al. Genotoxic and cytotoxic effects of polyethylene microplastics on human peripheral blood lymphocytes[J]. *Chemosphere*, 2021, 272.
- [162] Prüst M, Meijer J, Westerink R H S. The plastic brain: Neurotoxicity of micro- And nanoplastics[J]. *Particle and Fibre Toxicology*, 2020, 17(1): 1-16.
- [163] Qiao R, Sheng C, Lu Y, et al. Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 662: 246-253.
- [164] Qiao R, Deng Y, Zhang S, et al. Accumulation of different shapes of microplastics initiates intestinal injury and gut microbiota dysbiosis in the gut of zebrafish[J/OL]. *Chemosphere*, 2019, 236: 124334. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.065>.
- [165] Ye G, Zhang X, Liu X, et al. Polystyrene microplastics induce metabolic disturbances in marine medaka (*Oryzias melastigma*) liver[J/OL]. *Science of the Total Environment*, 2021, 782: 146885. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146885>.
- [166] Suk K T, Kim D J. Gut microbiota: novel therapeutic target for nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 2019, 13(3): 193-204.
- [167] Wang C, Hou M, Shang K, et al. Microplastics (Polystyrene) Exposure Induces Metabolic Changes in the Liver of Rare Minnow (*Gobiocypris rarus*)[J]. *Molecules*, 2022, 27(3): 1-16.
- [168] Wang J, Tian H, Shi Y, et al. The enhancement in toxic potency of oxidized functionalized polyethylene-microplastics in mice gut and Caco-2 cells[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 903: 166057.
- [169] Yin K, Wang D, Zhang Y, et al. Dose-effect of polystyrene microplastics on digestive toxicity in chickens (*Gallus gallus*): Multi-omics reveals critical role of gut-liver axis[J]. *Journal of Advanced Research*, 2023, 52: 3-18.
- [170] Paul M B, Böhmert L, Hsiao I L, et al. Complex intestinal and hepatic in vitro barrier models reveal information on uptake and impact of micro-, submicro- and nanoplastics[J]. *Environment International*, 2023, 179: 108172.
- [171] Ohara T E, Colonna M, Stappenbeck T S. Adaptive differentiation promotes intestinal

- villus recovery[J]. *Developmental Cell*, 2022, 57(2): 166-179.e6.
- [172] Wakim K G. Physiology of the liver[J]. *The American Journal of Medicine*, 1954, 16(2): 256-271.
- [173] Han S, Shin Y, Jeong H E, et al. Constructive remodeling of a synthetic endothelial extracellular matrix[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 18290.
- [174] Li X, Zhang Y, Zhao H, et al. A Transfer Learning Approach for Microstructure Reconstruction and Structure-property Predictions[J/OL]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 1-13. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-31571-7>.
- [175] Davenport Huyer L, Zhang B, Korolj A, et al. Highly Elastic and Moldable Polyester Biomaterial for Cardiac Tissue Engineering Applications[J]. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 2016, 2(5): 780-788.
- [176] Shim K Y, Lee D, Han J, et al. Microfluidic gut-on-a-chip with three-dimensional villi structure[J]. *Biomedical Microdevices*, 2017, 19(2): 37.
- [177] Shi J, Liu S, Zhang L, et al. Smart Textile-Integrated Microelectronic Systems for Wearable Applications[J]. *Advanced Materials*, 2020, 32(5).
- [178] Shukla R K, Kumar A, Gurbani D, et al. TiO₂ nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells[J]. *Nanotoxicology*, 2013, 7(1): 48-60.
- [179] Eweje F, Ardonã H A M, Zimmerman J F, et al. Quantifying the effects of engineered nanomaterials on endothelial cell architecture and vascular barrier integrity using a cell pair model[J]. *Nanoscale*, 2019, 11(38): 17878-17893.
- [180] Wang H, Yin F, Li Z, et al. Advances of microfluidic lung chips for assessing atmospheric pollutants exposure[J]. *Environment International*, 2023, 172: 107801.
- [181] Fede C, Fortunati I, Weber V, et al. Evaluation of gold nanoparticles toxicity towards human endothelial cells under static and flow conditions[J/OL]. *Microvascular Research*, 2015, 97: 147-155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2014.10.010>.
- [182] Kim H J, Huh D, Hamilton G, et al. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow[J]. *Lab on a Chip*, 2012, 12(12): 2165-2174.
- [183] Huang Z, Weng Y, Shen Q, et al. Microplastic: A potential threat to human and animal health by interfering with the intestinal barrier function and changing the intestinal microenvironment[J/OL]. *Science of the Total Environment*, 2021, 785: 147365. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147365>.