

國立臺灣大學生物資源暨農學院生物產業機電工程學系

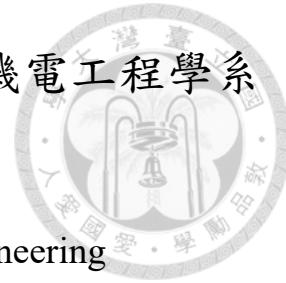
碩士論文

Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis



以小型肝細胞培養技術應用於肝臟晶片的開發

Liver-on-chip: Primary rat small hepatocytes in a
microfluidic platform

吳嘉浚

Chia-Chun Wu

指導教授：侯詠德 博士

Advisor: Yung-Te Hou, Ph.D.

中華民國 107 年 7 月

July 2018



誌謝

不知不覺也加入實驗室也滿四年了，承蒙侯詠德老師的細心教導，從一開始連 Pipette 都未曾使用，到現在學會且能使用一些生物分析的技術，老師一路上也用心的幫助我們找尋各種資源，使我們對一些問題的想法能夠真正的去嘗試，並且不分晝夜的解決我們研究、人生上的問題。同時也由衷的感謝陳力騏老師、鄭宗記老師及謝博全老師一路的照顧與提點，讓學生在研究過程中能藉由老師們的指點少走冤枉路。此外要感謝 MOC 團隊在實驗上給予的建議與協助。特別感謝劉承賢老師、陳惠玲老師、陳林祈老師、盧彥文老師出席學生的口試並給予論文上的指導，使學生的論文能更完整。

謝謝 Biolan 的大家：珂皞學長、夢汝學姐、嘉晏學姐、大剛學長、哲宇學長、慶育學長、生機蕭敬騰 Tony 大木博士、俊諺、智方、林延、健一、心慈，一路上的同舟共濟（一起玩耍、互相傷害）。謝謝成傳 11 的博鈞、柏睿、秀俊、俊寬、博亘、甫浩在週末陪我打球及一同抱怨實驗上的不順利。謝謝成大醫工所的林莉芳在實驗方法上給予的幫助（雖然很常不讀不回）。謝謝李胡丞一路上以一直給我中肯且切中要害的建議。謝謝 B01 的大家讓 306 充滿溫暖的氣息（什麼是 396 之友？）。

在此感謝柯 p 市長於 2018 年 7 月 11 日沒有放颱風假，讓我有機會完成我的口試。

最後，感謝我的家人，沒有你們的支持與照顧就無法完成這本論文，也希望遠在另一方的嫲嫲、爸爸、細姐姐，能看到我有一點點成長，並期望在未來的我能成為讓你們大家都放心的小孩。

吳嘉浚 謹誌

台灣大學生物產業機電工程學研究所 中華民國一〇七年八月十五日



摘要

肝臟具備合成代謝解毒等功能，然而肝臟的 *in vitro* study 常受限於無法完全長期評估體內情況，因此如何建立一個能精準模擬體內肝臟環境且能進一步作為藥物/毒物檢測的體外平台是所有肝臟研究者的共同願景。

本研究擬以微流道系統 (Microfluidic system) 建立一個新型的 Liver-on-chip 的培養平台，並使用大鼠的小型肝細胞 (Small hepatocyte) 作為細胞來源，小型肝細胞是肝臟前驅細胞 (Liver progenitor cell) 的一種，具有良好的分化與生存能力。由實驗結果得知小型肝細胞在 2D 培養環境下會形成大小約為 300-400 μm 的肝細胞聚落 (Colony)，且肝細胞生存活性會由原本的 5-7 天提升至 3-4 周；另一方面，以 Quantitative real-time PCR (qPCR) 方式進行基因表現檢測也發現小型肝細胞的白蛋白 (Albumin) 表現量隨著培養時間上升約 3 倍，且 Follistatin (小型肝細胞的 Marker) 隨著培養時間降低約 0.4 倍；而以次世代定序 (Next generation sequencing, NGS) 來進行基因表現檢測亦發現 Cytokeratin 18 (CK 18，成熟肝細胞的 Marker) 及 Cytokeratin 19 (CK 19，具膽管分化的肝細胞的 Marker) 表現量隨著培養時間皆升約 2 倍，且 Cluster of designation 44 (CD 44，小型肝細胞的 Marker) 降低約 7 倍；我們以免疫染色方式亦發現 CK18 之表現隨著培養時間上升。以上結果都證實了小型肝細胞除能分化為成熟肝細胞之外亦能於體外培養的環境下長時間維持其肝機能。

除了小型肝細胞的培養技術開發之外，本研究亦利用聚甲基丙烯酸甲酯 [(Poly(methyl methacrylate), PMMA] 開發一套僅需利用市售微波爐及雷射加工即可製作供細胞培養的微流道系統，其製作方式不但簡單容易，且比起傳統以聚雙甲基矽氧烷 [Poly(dimethylsiloxane), PDMS] 需花費 1~2 天才能製備而成的微流道而言約，PMMA 的微流道製程可以大幅度縮減至僅需 3~4 小時即可從微流道設計到微流道晶片實體完成；此外，我們亦成功於 PMMA 之微流道上來培養小型肝細胞，而細胞生存率更相較傳統 2D 培養提升約 27%。



利用小型肝細胞以及 PMMA 作為肝臟晶片 (Liver-on chip) 平台的開發不但製作簡單、亦具有潛力做為肝臟晶片之開發平台，相信也更能模擬真正的器官功能，因此能幫助我們能在體外建立藥物於肝臟代謝後的毒理數據。我們之後更將進一步對藥物，化學藥品和農藥於此肝臟平台進行安全性評估。相信這樣的技術對於未來肝臟晶片的研究開發有著拋磚引玉之效。

關鍵字：肝臟晶片、微流道、小型肝細胞。

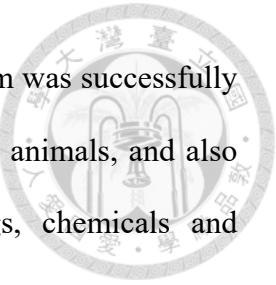


Abstract

The liver is an organ with vital functions, including energy storage, secretion protein synthesis, and especially metabolism of pharmaceutical drugs. However, *in vitro* studies of drug test are usually limited to precisely evaluate the real influences on hepatic tissue because it is an obstacle to develop a platform which can sophisticatedly mimic *in vivo* hepatic environment.

Thus, in this study we established a microenvironment-mimicking liver-on-chip (LOC) platform for *in vitro* hepatotoxicity test. Small hepatocytes, which have been identified in primary hepatocyte cultures with high potential for proliferation and differentiation into mature hepatocytes, was used as cell source for LOC platform. The result shows that small hepatocytes can survive in 2D primary cultures, and form 300-400 μm colonies for maintaining hepatocyte functions. Compared to primary hepatocytes, which normally maintain their function for about 7 days, small hepatocytes can survive at least 4 weeks. We analyzed the gene expression of small hepatocytes by q-PCR. Expression of albumin and Tryptophan 2,3-dioxygenase (marker of primary hepatocytes) are 3 times and 120 times increase, whereas Follistatin (marker of small hepatocytes) expression is 0.4 times decrease, after 2 weeks of culture. We also analyzed the RNA expression by NGS. The expression of CK18 and CK19 increase 2 times whereas CD44 decreases 7 times, after 2 weeks of culture.

On the other hand, poly(methyl methacrylate) was utilized to fabricate microfluidic devices. The substrates are patterned using the laser cutter, and bonded in a commercial microwave. Compared to the traditional PDMS fabrication process (usually needs 1~2 days), this bonding process is very simple and can therefore save more time (only 3~4 hours). Besides, the viability of small hepatocytes in poly(methyl methacrylate)-microfluidic devices is 27% higher than that in 2D primary cultures.



In summary, the small hepatocytes-derived liver-on-chip platform was successfully developed and therefore can simulate the real environment in model animals, and also build toxicology database and make safety assessment of drugs, chemicals and pesticides in the future.

Keyword : Live-on-chip, Microfluidic system, Small hepatocytes



目錄

致謝	iii
摘要	ii
Abstract.....	iv
目錄	vi
圖目錄	ix
表目錄	xiv
第一章 前言	1
1.1 背景	1
1.2 研究目的	2
1.3 研究架構	3
第二章 文獻探討	4
2.1 藥物研發工程	4
2.2 動物福利	5
2.3 器官晶片	6
2.4 肝臟功能及 Liver-on chip	7
2.5 肝前驅細胞	10
2.6 Poly(dimethylsiloxane) 微流道系統.....	10
2.7 PDMS 微流道系統應用於細胞培養	12
2.8 PDMS 微流道系統應用於肝細胞培養	16
2.9 Poly(methyl methacrylate)微流道系統	21
2.9.1 PMMA 微流道系統製作	21
2.9.2 PMMA 微流道系統黏合	25
第三章 試驗設備與方法	27
3.1 實驗藥品、耗材、儀器設備與實驗動物	27



3.1.1	實驗藥品	27
3.1.2	儀器設備	28
3.1.3	實驗耗材	28
3.1.4	實驗動物	29
3.2	細胞懸浮液組成分析	29
3.3	膠原蛋白修飾培養皿製備	29
3.4	肝細胞採取與培養	30
3.5	肝細胞於經光固化膠處理的 PMMA 上進行培養	32
3.6	PMMA 微流道晶片製程及細胞培養	33
3.7	實驗相關檢測方法	34
3.7.1	免疫螢光染色	34
3.7.2	白蛋白 (Albumin) 分泌量檢測	34
3.7.3	Quantitative real-time PCR (qPCR)	35
3.7.4	尿素 (Urea) 分泌量檢測	38
3.7.5	次世代定序 (Next generation sequencing, NGS)	38
第四章	結果與討論	40
4.1	細胞懸浮液組成分析結果	40
4.2	肝細胞培養結果	41
4.2.1	利用不同分離步驟來採取小型肝細胞之比較	41
4.2.2	小型肝細胞與成熟肝細胞於體外培養之型態比較	43
4.3	活體螢光染色	46
4.4	Quantitative real-time PCR	49
4.5	次世代定序 (NGS)	51
4.6	肝細胞之白蛋白分泌量	52
4.7	肝細胞之尿素分泌量	54
4.8	PMMA 微流道製作結果	55



4.8.1	肝細胞於經光固化膠處理的 PMMA 上進行培養之結果	55
4.8.2	PMMA 微流道表面處理結果比較	56
4.9	小型肝細胞於 PMMA 微流道培養結果	57
4.9.1	於不同濃度膠原蛋白修飾的微流道之培養結果比較	57
4.9.2	以膠原蛋白修飾的培養皿與微流道之培養結果比較	59
第五章	結論與未來展望	60
5.1	結論	60
5.2	未來展望	62
參考文獻	63



圖 目 錄

圖 1-1 肝細胞培養技術應用於 PMMA 肝臟晶片的開發之示意圖	3
圖 2-1 藥物研究及發展步驟 (Evaluate Pharma, 2016)	4
圖 2-2 2015 年全球發展中藥物之管制階段 (Evaluate Pharma, 2016)	5
圖 2-3 Difference between Prodrug and Active Drug (CEPMED)	8
圖 2-4 A representation of the diffusion-based membrane pumping method for (A) applied pressure and (B) an applied vacuum (Eddings and Gale, 2006)	11
圖 2-5 Overview of advantages and challenges of both macroscopic and microfluidic cell culture (Kim <i>et al.</i> , 2007)	15
圖 2-6 Microfluidic endothelial-like barrier properties (Lee <i>et al.</i> , 2007)	16
圖 2-7 The flowchart of U-shaped microstructure fabrication, cell trapping and spheroid formation (Fu <i>et al.</i> , 2010)	18
圖 2-8 Liver-cell patterning Lab Chip: mimicking the morphology of liver lobule tissue (Liu <i>et al.</i> , 2013)	19
圖 2-9 Long-term maintenance of a microfluidic 3D human liver sinusoid (Prodanov <i>et al.</i> , 2016)	20
圖 2-10 Schematic drawing of the hot embossing equipment and Replication of this structure in PMMA (The channels are 0.8 mm wide.) (Becker and Heim, 2000)	21
圖 2-11 Room-temperature imprinting of microfluidic channels using silicon template, microscopic images of top view and cross section of an imprinted PMMA device (Xu <i>et al.</i> , 2000)	22
圖 2-12 Configuration of a direct-write laser machining system and SEM image of the cross-section of an unsealed laser machined microchannel (Cheng <i>et al.</i> , 2004) ..	23
圖 2-13 Schematic of the etching process and representative analysis of an etched channel by SEM (Brister and Weston, 2005)	24

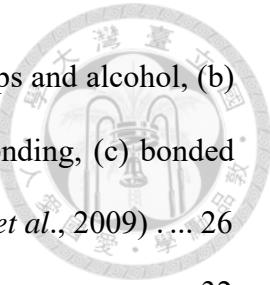


圖 2-14 Picture of the bonding setup (a) PMMA channels with clips and alcohol, (b) PMMA and water placed in a commercial microwave just before bonding, (c) bonded microfluidics (ethanol, 90 s) showing over 90% bonded area (Rahbar <i>et al.</i> , 2009)	26
圖 3-1 Two-step collagenase perfusion 示意圖	32
圖 3-2 在 Dish 上的標記來固定位置觀察小型肝細胞之實際情況。	32
圖 3-3 PMMA 微流道之設計 (單位 : mm) 。	34
圖 3-4 RNA 萃取步驟示意圖 (Kopec <i>et al.</i> , 2017) 。	36
圖 3-5 NGS 流程示意圖。 (Wang, Gerstein, and Snyder, 2009)	39
圖 4-1 小型肝細胞分離步驟之細胞懸浮液經 Cytocentrifuge 後在螢光顯微鏡下所觀察的結果； (A) 、 (B) 為 CK18 下之染色結果； (C) 、 (D) 為 CK19 下之染色結果。藍色：DAPI 為細胞核之染劑，綠色：CK18 為成熟肝細胞之 Marker ，紅色：CK19 為肝前驅細胞之 Marker 。 (Scale bar = 100 μm).....	40
圖 4-2 利用不同分離步驟來採取小型肝細胞並培養於 Dish 上之比較； (A) 為 Chen, Q 及其團隊之採取方式 (150 g 、 5 分鐘、 4 °C , 取上清液) 下培養 1 天之結果， (B) 為 Chen, Q 及其團隊之採取方式下培養 3 天之結果， (C) 為 Chen, Q 及其團隊之採取方式下培養 5 天之結果； (D) 為本研究將 Chen, Q 的方法進行調整後之採取方式 (150 g 、 5 分鐘、 4 °C , 取 cell pellet) 下培養 1 天之結果， (E) 為調整後之採取方式下培養 3 天之結果， (F) 為調整後之採取方式下培養 6 天之結果，以上皆使用相位差顯微鏡所觀察的結果 (Scale bar = 200 μm) 。	42
圖 4-3 肝細胞在 Dish 培養下使用相位差顯微鏡所觀察的結果； (A) 為培養 1 天的成熟肝細胞， (B) 為培養 3 天的成熟肝細胞， (C) 為培養 5 天的成熟肝細胞， (D) 為培養 7 天的成熟肝細胞； (E) 為培養 1 天的小型肝細胞， (F) 為培養 3 天的小型肝細胞， (G) 為培養 6 天的小型肝細胞， (H) 為培養 9 天的小型肝細胞。 (Scale bar = 200 μm) 。	44
圖 4-4 小型肝細胞在 Dish 長時間培養下，在相近位置 (如圖 3-2 所示) 使用相位差顯微鏡所觀察的結果； (A) 為培養 1 天的小型肝細胞， (B) 為培養 3 天的	

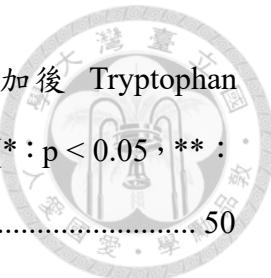


小型肝細胞，(C) 為培養 6 天的小型肝細胞，(D) 為培養 9 天的小型肝細胞，(E) 為培養 12 天的小型肝細胞，(F) 為培養 15 天的小型肝細胞，(G) 為培養 18 天的小型肝細胞，(H) 為培養 21 天的小型肝細胞，(I) 為培養 24 天的小型肝細胞。(Scale bar = 500 μ m) 45

圖 4-5 為小型肝細胞在 Dish 下培養 12 及 35 天，分別以相位差顯微鏡以及螢光顯微鏡所觀察之結果；(A) 為培養 12 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果，(B) 為培養 35 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果，(C) 為培養 12 天的小型肝細胞在螢光顯微鏡下之觀察結果，(D) 為培養 35 天的小型肝細胞在螢光顯微鏡下之觀察結果。藍色：DAPI，綠色：NucGreen[®] Dead reagent。(Scale bar = 100 μ m) 。 47

圖 4-6 為小型肝細胞在 Dish 下培養 1、3、8、15 天後分別於相位差顯微鏡及螢光顯微鏡所觀察的結果；(A) 為培養 1 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果，(B) 為培養 3 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果，(C) 為培養 8 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果，(D) 為培養 15 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果；(E) 為培養 1 天的小型肝細胞在螢光顯微鏡下之觀察結果，(F) 為培養 3 天的小型肝細胞在螢光顯微鏡下之觀察結果，(G) 為培養 8 天的小型肝細胞在螢光顯微鏡下之觀察結果，(H) 為培養 15 天的小型肝細胞在螢光顯微鏡下之觀察結果；(I) 為培養 1 天的小型肝細胞於兩種顯微鏡觀察結果之組合，(J) 為培養 3 天的小型肝細胞於兩種顯微鏡觀察結果之組合，(K) 為培養 8 天的小型肝細胞於兩種顯微鏡觀察結果之組合，(L) 為培養 15 天的小型肝細胞於兩種顯微鏡觀察結果之組合。藍色：DAPI，綠色：CK18。(Scale bar = 100 μ m) 48

圖 4-7 小型肝細胞於培養於 Dish 上 3、7、15 天後的 Quantitative real-time PCR 結果；(A) 為小型肝細胞隨著培養時間增加後 Albumin (肝機能) 的 RNA 表現之結果，(B) 為小型肝細胞隨著培養時間增加後 Follistatin (小型肝細胞之 Marker) 的 RNA 表現之結果，(C) 為小型肝細胞隨著培養時間增加後 CYP1A2 (肝機能)



的 RNA 表現之結果，(D) 為小型肝細胞隨著培養時間增加後 Tryptophan 2,3-dioxygenase (小型肝細胞的 Marker) 的 RNA 表現之結果。(*: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001 significant difference vs. Day3).....	50
圖 4-8 小型肝細胞於培養於 Dish 上 7、14 天後的次世代定序的結果。.....	51
圖 4-9 成熟肝細胞與小型肝細胞於 Dish 上隨著培養時間的白蛋白分泌量之變化情況。(*: p < 0.05, **: p < 0.01 significant difference vs. small hepatocyte at Day1；++: p < 0.01, +++: p < 0.001 significant difference vs. Mature hepatocyte at Day1).....	53
圖 4-10 成熟肝細胞與小型肝細胞於 Dish 上隨著培養時間的增加，其尿素分泌量之變化情況。.....	54
圖 4-11 為成熟肝細胞在不同 PMMA 黏合材料下培養 1 天，以相位差顯微鏡所觀察之結果；(A) 塗有光固化膠的 PMMA 上培養 1 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果，(B) 無處理的 PMMA 上培養 1 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果。(Scale bar = 200 μm).....	55
圖 4-12 為 PMMA 微流道表面處理前後，以相位差顯微鏡所觀察之結果；(A) 未經 Acetone/Ethanol 前處理的 PMMA 微流道在相位差顯微鏡下之觀察結果，(B) 經 Acetone/Ethanol 前處理的 PMMA 微流道在相位差顯微鏡下之觀察結果。(Scale bar = 500 μm)。上述的結果均只有 PMMA 微流道的型態觀察而無任何細胞種植於上。.....	56
圖 4-13 為小型肝細胞在修飾不同濃度的膠原蛋白濃度 PMMA 流道下培養 1 天，分別以相位差顯微鏡以及螢光顯微鏡所觀察之結果；(A) 為修飾 0.1 mg/mL 的膠原蛋白的 PMMA 微流道上培養 1 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果，(B) 為修飾 0.3 mg/mL 的膠原蛋白的 PMMA 微流道上培養 1 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果，(C) 為修飾 0.1 mg/mL 的膠原蛋白的 PMMA 微流道上培養 1 天的小型肝細胞在螢光顯微鏡下之觀察結果，(D) 為修飾 0.3 mg/mL 的膠原蛋白的 PMMA 微流道上培養 1 天的小型肝細胞在螢光顯微鏡下之觀察結果。藍色：DAPI，綠色：NucGreen® Dead reagent。(Scale bar = 200	



μm) 。 58

圖 4-14 為小型肝細胞在 Dish 及 PMMA 流道下培養 1 天，分別以相位差顯微鏡以及螢光顯微鏡所觀察之結果，(A) 為 Dish 上培養 1 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果，(B) 為 PMMA 流道上培養 1 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果，(C) 為 Dish 上培養 1 天的小型肝細胞在螢光顯微鏡下之觀察結果，(D) 為 PMMA 流道上培養 1 天的小型肝細胞在螢光顯微鏡下之觀察結果。藍色：DAPI，綠色：NucGreen® Dead reagent。 (Scale bar = 100 μm) 。 59



表目錄

表 2-1 Historical background of animal cell culture (Nema and Khare, 2012)	13
表 2-2 Basic requirements for cell culture, and improvements when microfluidic methods are used (Mehking <i>et al.</i> , 2014)	15
表 3-1 Quantitative real-time PCR 所使用之引子序列。	37



第一章 前言

1.1 背景

肝臟是人體最重要的器官之一，具備了蛋白質合成、營養物質的代謝及氨等化合物的解毒功能 (Hou *et al.*, 2012) ，然而肝臟的基礎研究往往受限於無法完全模擬體內的情況，最終仍須進行大量的動物實驗來得以佐證，因此如何在減少動物實驗及人體實驗的前提下，建立一個能精準模擬體內環境的藥物/毒物檢測平台相信是所有人類的共同願景 (Rajendran *et al.*, 2017) 。

現今發展的肝臟晶片 (Liver-on-chip, LOC) 已行之有年，有團隊利用微流道系統 (Microfluidic system) 仿微血管結構以模擬肝臟細胞在體內所受流體壓力及擴散狀態 (Lee *et al.*, 2007) ，亦有另外的團隊利用 U-shape 的設計將肝細胞三次元球 (Spheroid) 限制在流道內進行 3D 培養 (Yu *et al.*, 2010) ，除此之外，也有研究團隊在流道上進行肝細胞三次元球與內皮細胞的共培養 (Yamada *et al.*, 2012) 。而在 2016 年 Ljupcho P. 與團隊更進一步利用雙層微流道來模擬肝臟內不同種類的細胞在體內的分佈情況 (Prodanov *et al.*, 2016) ，這樣的創新做法使一般認知無法在體外培養 (*in vitro* cultures) 中有辦法長時間生存的初代肝細胞 (Primary hepatocyte) ，有可能在適當的體外流道培養環境下仍能維持至少四週的生存活性及機能。然而，微流道的多層設計及不同種類細胞的共培養都有其一定的製作及培養上的困難性，應而侷限了肝臟生物晶片在學界及產業界被大力推廣的可能性。



1.2 研究目的

為了克服肝臟的基礎研究往往受限於無法完全模擬體內的情況、且多層微流道製作之困難，本研究擬以單層微流道系統建立一個新型的 Liver-on-chip 的肝細胞培養平台，期望能建立一個更能符合體內環境，且能長時間培養的生物測試平台來提高藥物/毒物快篩靈敏度。

目前發展的肝臟生物晶片，所使用的細胞來源主要是肝癌細胞株 (Liver hepatocellular cells, HepG2) 及初代肝實質細胞 (Primary hepatocyte)，然而肝癌細胞株無法真實模擬肝臟機能 (Wilkening, Stahl and Bader, 2003)；而初代肝實質細胞在體外培養亦會隨著時間而逐漸失去其肝臟細胞的特性，最後更因為 Epithelial-mesenchymal transition (EMT) 的機制，使初代肝細胞去分化而成為纖維細胞 (Fibroblast) (Choi and Diehl, 2009; Zeisberg *et al.*, 2007)，因此初代肝細胞一般認為無法在體外進行長時間的培養。小型肝細胞 (Small hepatocyte) 被認為是肝臟前驅細胞 (Liver progenitor cell) 的一種，其分化過程介於肝臟卵母細胞 (Liver oval cell) 與初代肝細胞之間 (Chen *et al.*, 2013; Shilbata *et al.*, 2006; Mizuguchi *et al.*, 1998)。有文獻指出小型肝細胞在體外培養時，會先形成扁平的聚落 (Colony) 形式，之後細胞聚落會開始向上堆積並擁有初代肝細胞之外觀，且能在體外表現類似於體內所見的肝功能如蛋白質生產 (Albumin synthesis) 和膽紅素代謝 (Bilirubin metabolism) 等 (Ishii *et al.*, 2017)。小型肝細胞不但可以分化成具有膜極性，分泌能力和運動性的初代肝細胞，亦能增殖且在體外的長時間培養環境下維持機能，因此被認為是用於肝組織重建的合適細胞來源 (Avril *et al.*, 2004; Mitaka *et al.*, 1995)。

因此，本研究希望就目前藥物研發及測試之需求，嘗試以小型肝細胞來建立更貼近生理下肝臟功能之器官晶片。



1.3 研究架構

本研究第一步先以小型肝細胞作為初步研究對象，確認以論文之方式採集之細胞為小型肝細胞後，之後再進一步確認小型肝細胞相較於成熟肝細胞在進行體外培養的機能及活性有較高的表現，且有更長的細胞機能的維持時間。另一方面，我們擬嘗試以 PMMA 微流道，而非一般所使用的 PDMS 微流道系統，作為肝臟細胞的培養平台，因 PMMA 製程步驟相較 PDMS 更來的簡單快速。此外，本研究亦針對 PMMA 微流道之製作方式進行探討並測試 PMMA 之對細胞生長是否有影響，最後將細胞於 PMMA 微流道上進行培養，並檢測其肝細胞生存率與肝機能，並與其於 Dish 上培養之結果進行比較。

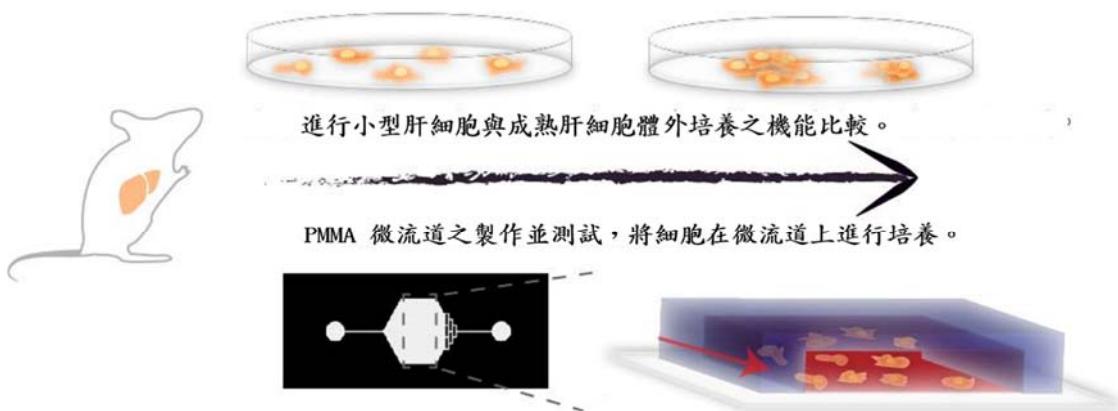


圖 1-1 肝細胞培養技術應用於 PMMA 肝臟晶片的開發之示意圖



第二章 文獻探討

2.1 藥物研發工程

藥物研發工程一直在醫學及衛生安全上扮演著為目前已知疾病來研發預防和治療的藥物及疫苗，進而改善病人的治療品質。而藥物研發工程的成效取決於為了常見、複雜和被忽視的疾病來創新預防和治療的方式，並進一步修正現有治療方法。但是其研發所需要的時間、金錢甚至承擔的風險都要較大多科技行業來得高。有研究統計，研究人員平均需 5000-10,000 次的測試才有可能篩選出具有潛力作為藥物的化合物 (Evaluate Pharma, 2016) ，之後要接著對該化合物不斷的在動物及人體上進行測試，以確保其功效和安全性，然而這一過程可能耗費 10 至 15 年的時間 (圖 2-1) (Evaluate Pharma, 2016) 。事實上，從有潛力作為藥物的化合物到最終真正能成為產品的成功率並不高，舉例而言，2015 年成功上市的新藥物有 56 種，但同年有超過 7000 種的化合物在進行不同階段的藥物測試 (圖 2-2) (PhRMA, 2017) ，而這兩數字的差異凸顯了在有潛力作為藥物的化合物確認成為安全有效的藥物之前，需要克服的許多研究障礙。

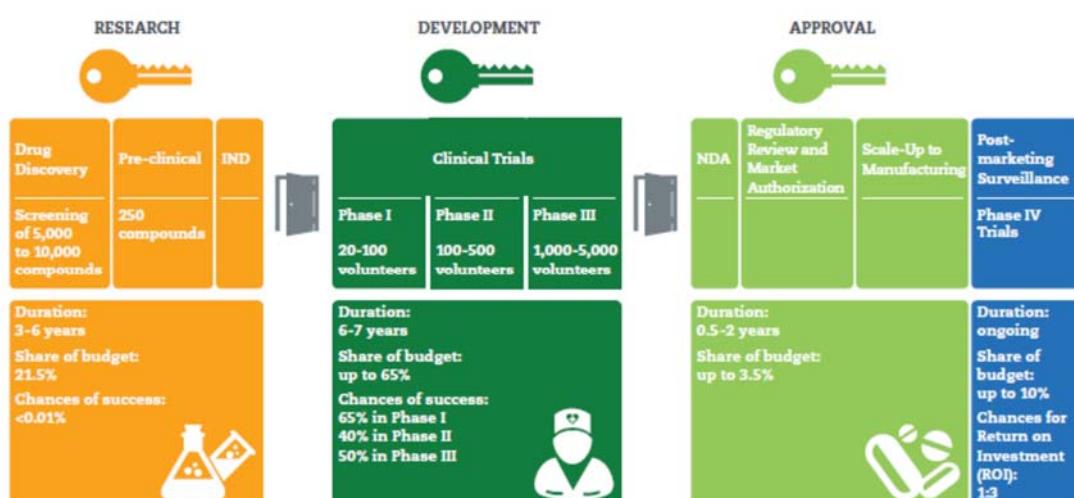


圖 2-1 藥物研究及發展步驟 (Evaluate Pharma, 2016)

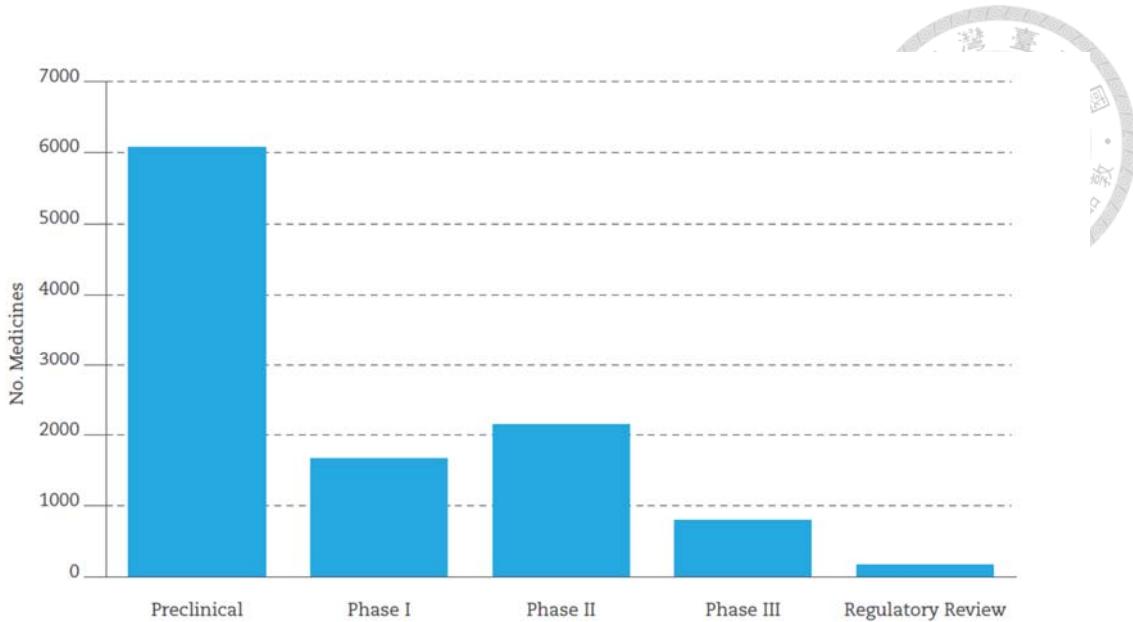


圖 2-2 2015 年全球發展中藥物之管制階段 (Evaluate Pharma, 2016)

另外一方面，動物模型 (Animal models) 一直在藥物研發中扮演重要的角色。新藥在進行研發時，常利用動物模型建立其對特定部位疾病的評估並檢視其療效，並進一步記錄安全劑量和致毒性在臨床上的反應，以預測臨床試驗時人體給藥和藥物的安全性 (PhRMA, 2017)。然而，動物模型之使用時機及方式隨動物福利之觀念上漲而逐漸受到世人的重新審視。

2.2 動物福利

動物福利泛指動物的生活品質，其內涵包括：動物的健康、餵食是否足夠和安全舒適的環境，使動物本身不會感受壓力、恐懼和痛苦。而大眾對動物福利的關注從防止野生動物的濫捕、圈養動物被殘暴對待，慢慢擴大至於科學中動物模型的使用，因此學界為改善動物模型之使用，明確採用一套指導動物使用時倫理評估的原則。這就是「三 Rs」原則：分別為取代 (Replacement)、減少 (Reduction) 和優化 (Refinement) (McGonigle *et al.*, 2014)。其原則為當研究者在無法找出非動物性替代物時，才能使用動物，並且當需要動物時，要採用人道的方法且能獲得有效信息所需的最少數量的動物。「取代」的意義為避免或以其它替代方式來取代



動物實驗，方法包括（1）絕對取代：用無生命系統取代動物模型，如計算機程序；和（2）相對取代：以目前科學證據表明具有較低疼痛感知潛力的動物（如某些無脊椎動物）取代較有知覺的意動物（如脊椎動物）。「減少」是指採用任何手段以較少的動物使用而能獲得足夠的數據來回答研究問題，或最大限度地利用每隻動物得到的信息，從而避免隨後使用額外的動物。「優化」是指修改實驗程序，以盡量減少痛苦，且提高從出生至犧牲時的照護（Fenwick *et al.*, 2014）。

2.3 器官晶片

隨著動物福利意識的抬頭，以及現有的動物模型及體外細胞測試往往與實際臨床結果的不一致的情況之下，使得藥物研發工程最後常導致成本上漲以及效率下降，因此各方研究者都對新的測試方法有迫切需求，以期能產生對人類藥物功效和安全性的可靠預測。近年來，微製程細胞培養模型的建立開發提供了一種新型的解決方案，這類模型利用微加工和微流道技術，以高三維精確度控制細胞微環境來重現體內環境，以期待利用晶片來培養細胞時能重現多種細胞間的信號傳遞。而這類微型培養模型的發展，我們統稱為器官晶片（Organ-on-chip），目的是在微型的晶片上能重現人體器官的複雜結構、微環境和生理功能（Esch *et al.*, 2015）。器官晶片通常具有人類器官的關鍵功能，它們是以具透明性質之聚合物為材料製作出微米等級之通道，並在此通道內排列體細胞以模仿活體器官的三個重要特徵，包括：（1）多種組織組成的立體微結構、（2）組織—組織之界面環境及（3）器官特異性之生化微環境（Huh *et al.*, 2011）。近年來，這類仿生微系統模型已被用於重現功能複雜性的人體器官如肝臟、心臟，肺和骨骼（Huh *et al.*, 2012）。

而其較傳統的平面培養（單層培養）的相比，器官晶片由於是利用微製程來真實模擬體內組織結構，因此可以增長細胞在體外培養之存活時間及增強其機能（Halldrorsson *et al.*, 2015），以下為一些利用微製程技術嘗試在體外環境下再現器官結構之例子：如 Lee 的研究團隊利用流道壁上製造微小之通透孔使培養基僅能



藉有小孔通過至細胞端，以模擬血管壁或細胞緊密排列使物質較不易傳輸造成屏障 (Lee *et al.*, 2007) ，此微流道晶片培養的方式較平面單層細胞培養更能準確地模擬體內環境，這是因為藥物化合物在體內需經血管屏障才能遞送至目標組織 (Stella, 2004) 。另外一方面，亦有研究控制晶片內培養基之流動或腔室的收縮，以在體外能夠再現由生理流動 (如血流) 或組織收縮 (如肺部、肌肉) 所造成的各種類型之機械應力，這些應力包括流體剪切應力，張力，壓縮和扭矩等 (van der Meer *et al.*, 2012; Esch *et al.*, 2015) 。

此外，動物模型雖然比起在體外細胞層級下所進行的測試能更有效地模擬藥物在實際生理上的反應情況，但由於疾病途徑和疾病誘導的基因變化存在著物種間差異，使得人類疾病於實驗動物上的反應與其在人類上之反應之間，有著相當的不一致性 (Seok *et al.*, 2013) 。而現今的器官晶片研究之所以普遍受到重視，除了因為晶片本身的透明性和容易從特定組織類型中進行採樣之外，微流道高通量的設計更讓這個平台具備減低成本以及大量且即時檢測的優勢，這樣的方式相信更能有助於鑑定新的藥物功效、毒性或了解藥物/毒物於特定部位之細胞代謝過程。除此之外，為了讓器官晶片比起動物模型更能符合人體真實生理情況，人類初代細胞為一最理想的細胞來源，因其能更精準的預測藥物在人體中的藥物動力學。但其主要問題為缺少細胞捐贈者及培養所需的成本較高，因此目前細胞系 (Cell line) 及動物初代細胞 (Animal primary cells) 仍為主要的細胞來源 (Kimura, Sakai and Fujii, 2017) 。

2.4 肝臟功能及 Liver-on chip

肝臟為一功能複雜的器官，具有儲存能量、合成分泌性蛋白等功能，也是人體中大多藥物及毒物代謝之場所 (Park and Lee, 2005) 。因此對藥物開發而言，若能在體外建立一套能精準模擬體內代謝系統之 Liver-on chip ，除了能初步了解一般藥物 (Active drug) 對特定細胞是否具有毒性之外，更能進一步能了解前驅藥物



(Prodrug) 經過肝臟代謝後所產生的代謝物與特定部位之細胞進行培養觀察其反應，以瞭解這類藥物在體內的作用及機轉 (Stella, 2004)。

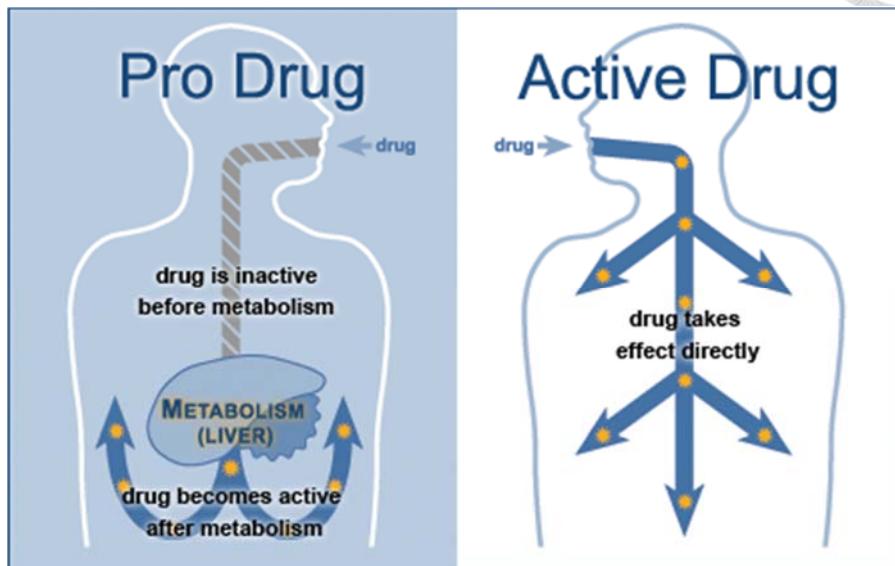
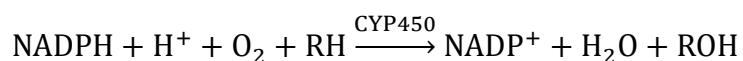


圖 2-3 Difference between Prodrug and Active Drug (CEPMED)

不論是 Active drug 或是 Prodrug，這些口服藥物進到體內後都會藉由肝門循環進到肝臟 (Pang, 2007)。而肝臟代謝最終目的為將親脂性化合物轉化為較為親水性使其方便排出。其機轉可分為 Phase I、Phase II。Phase I 最常見的代表是 CYP450 家族，其重要的作用為親脂性化合物的甲基團經煙化作用後，轉化為較溶於水之代謝物，(Almazroo *et al.*, 2017) 其催化之反應式為：



Phase II 又稱作接合反應，按照需代謝物之種類，將特定之化合物接合至需代謝的物質上，使這些代謝物水溶性更高而且更容易被排泄。Phase II 反應包含：葡萄糖醛酸接合 (Glucuronide conjugation)、硫酸接合 (Sulfate conjugation)、甲基化 (Methylation)、乙醯化 (Acetylation)、氨基酸接合 (Conjugation with Amino Acids) 及穀胱甘肽接合 (Glutathione conjugation) (Almazroo *et al.*, 2017)。

為了達到與生理上的肝臟有相似之功能，Liver-on chip 擬利用微製程方式來



模擬肝臟微環境，且按照體內實際情況之分布將肝實質細胞 (Parenchymal liver cells, Hepatocyte) 與非實質細胞 (Non-parenchymal liver cells) 在晶片上排列以達到更好之共培養效果 (Lee *et al.*, 2015)。而目前 Liver-on chip 之研究除了圍繞著 (1) 如何將細胞排列，例如利用微製程做出柱狀結構並在柱頂上修飾特定材料，再以蓋章 (Stamps) 的方式在同一平面不同位置上，來印上不同材料來使不同細胞貼附 (Khetani *et al.*, 2008)、或是使細胞在緩衝液中使其帶電再利用外加電場使其貼附排列 (Ho *et al.*, 2006)；及 (2) 模擬肝臟內之微結構如：仿微血管結構 (Lee *et al.*, 2007)、或利用雙層流道模擬肝臟內不同種類的細胞在體內的分佈情況 (Prodanov *et al.*, 2016)；此外，也嘗試 (3) 利用三次元細胞球以增加細胞間的交互溝通 (Yu *et al.*, 2010)。

由上段的既往文獻可知，Liver-on chip 主要目的是模仿人類肝臟功能，希望能在不依賴於臨床試驗即可得知肝臟對內源性及外源性因素的反應。因此以人類肝細胞作為晶片之細胞源是最終目的，因為只有人類肝細胞才能依賴於真正的人類肝臟的反應，但人類正常肝細胞的來源取得不易也侷限了其應用性。另外一方面，動物的初代肝細胞 (如 Rat primary hepatocytes) 和細胞系 (如 HepG2) 由於取得容易且易於培養及觀察，這兩種細胞雖不能完全表現出與人類肝細胞相同的特徵，但仍能表現一部份正常肝細胞的基因型特徵，且其表型亦較穩定 (Phenotypic stability) (Wilkening, Stahl and Bader, 2003)，因此也普遍為研究者所使用。然而初代肝細胞在體外的機能會隨培養時間而降低 (van der Meer *et al.*, 2012)；而細胞系之細胞由於伴隨著某些基因缺陷，且與初代肝細胞相比代謝能力較低，使其僅適用於對不需代謝即具有毒性之分子來進行劑量測試，但不適合 Prodrug 類藥物之毒性測試，這些困難點都使得這兩種細胞在直接做為肝臟晶片的細胞來源時，會造成研究進展的障礙 (Gerets *et al.*, 2012)。因此，幹細胞研究的蓬勃發展便有可能為上述的問題提供了解決的方案，人類誘導性多能幹細胞 (Induced pluripotent stem cell, iPSCs) 及肝前驅細胞 (Liver progenitor cells) 為目前較有希望的幹細胞來源，因它們可以大量的分化細胞而較不違反倫理學 (Yu *et al.*, 2007)。然而，從體細胞



反轉化為 iPSCs 良率不高，此外，其分化過程亦需要良好控制否則可能在培養時分化為非目標細胞，因此綜合而言效率仍低於一般肝前驅細胞 (Lee *et al.*, 2015)。因此，本研究的一個重要途徑即為優化肝細胞來源，以作為 Liver-on chip 的潛在細胞來源應用。

2.5 肝前驅細胞

由於目前肝前驅細胞分化的效率和功能仍高於 iPSCs (Lee *et al.*, 2015)，因而是一個相對較優勢的潛在細胞來源。肝前驅細胞目前研究指出有卵圓細胞 (Oval cells) 和小型肝細胞兩種，兩者皆具有分化為成熟肝細胞及膽管細胞之能力 (Chen *et al.*, 2013)，其中有研究指出卵圓細胞在許多不同的損傷模型中，Canals of Hering 會被活化並開始遷移到肝葉 (Hepatic lobules) 中並分化 (Fausto *et al.*, 2003)；另外一方面，小型肝細胞目前被指出會出現於齧齒動物且亦具有增殖能力，此外，與卵圓細胞不同的是，小型肝細胞在採集步驟中可不需先對肝臟進行損傷處理 (Chen *et al.*, 2007)，而幾項證據也表明小型肝細胞不會從卵圓細胞中產生 (Gordon *et al.*, 2000)。小型肝細胞培養形態為細胞聚落 (Colony)，聚落的形成是起源於單細胞，並體外在培養 8-10 天後組成約 30-40 個細胞之堆疊。而其聚落表現之細胞型態與成熟肝細胞相似，皆以多邊形形狀貼附於平面生長，但兩細胞之間的大小仍有所不同 (Ishii *et al.*, 2017)。

因此，本研究欲利用齧齒動物中相較卵圓細胞易取得、且亦有肝前驅細胞特性之小型肝細胞做為細胞源，來建立一套 Liver-on chip 測試平台，並確認其與體內肝細胞之功能表現差異。我們之後會進一步證實以肝前驅細胞作為細胞來源之 Liver-on chip 的效用，期待能將肝前驅細胞應用於晶片上。

2.6 Poly(dimethylsiloxane) 微流道系統

微流道系統 (Microfluidic system) 根據 George Whitesides 將其定義為 “It is



the science and technology of systems that process or manipulate small (10^{-9} to 10^{-18} liters) amounts of fluids, using channels with dimensions of tens to hundreds of micro meters." (Whitesides, 2006) 。微流道系統應用於生化分析上的優勢為：只需少量的樣品及反應試劑、具有高靈敏度、本體體積小且從發想設計到實際做出原型所需時間短（可在 2 天內做出一原型晶片）(Whitesides, 2006)。微流道系統最初製作用之材料多為玻璃及矽，但其材料之特性如矽在可見光和紫外光波段下並不透明，使得一般光學檢測方式較難進行；此外，由於玻璃及矽的材質質地較為堅硬，因此較難在其設計上做出一些微分析系統所需的彈性組件，如幫浦、閥門等。為了克服上述缺失，有研究團隊開始使用高分子材料做為微流道系統之基材，又其中以 Poly(dimethylsiloxane) (PDMS) 較被廣泛使用。其材料特性為光學透明，此外，相較於傳統玻璃及矽材料更具有彈性，使其能藉微流道本身設計、多層結構和導入流體的種類（氣體或液體）可組合建構出管道、幫浦、閥門及混合器等（圖 2-4），使微型生化「工廠」濃縮在一片晶片上可行的。

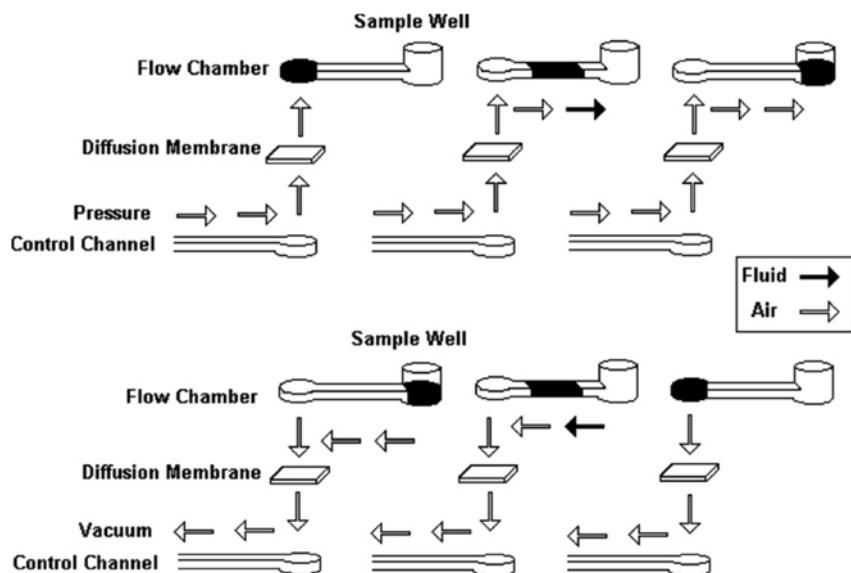


圖 2-4 A representation of the diffusion-based membrane pumping method for (A) applied pressure and (B) an applied vacuum (Eddings and Gale, 2006) .



而有足夠的製造方法和組件後，微流道系統的建立就有潛力為基礎/應用問題尋找可能的解決方式，而不再僅僅是為了原理示範或是單純技術的展示。目前的微流道技術已普遍應用如：篩選蛋白質結晶的條件（如 pH，離子強度和組成，助溶劑和濃度）、高通量之方式篩選開發中的藥物、檢查和操作由單個細胞或單個分子組成的樣品以及用於合成正電子發射斷層掃描所需之¹⁸F- 標記的有機化合物等 (Whitesides, 2006)。

2.7 PDMS 微流道系統應用於細胞培養

細胞培養是在實驗室的環境中模仿真實體內環境（如 pH, CO₂, 溫度等），使得細胞於體外培養時的機能、活性及型態能夠重現如體內的生長狀況 (Halldrorsson *et al.*, 2015)。而目前主流使用的體外培養平台為 Petri dish，這是於 1887 年由 J. R. Petri 將 Robert Koch 所使用之培養細菌之系統進行改良，Robert Koch 之系統架構為將細菌和明膠培養基一起倒在一玻璃板上後，再蓋上一玻璃鐘型外罩，最後加熱整個系統以供培養菌落，但其缺點為在顯微鏡下不易觀察 (Roberts, 2014)；因此 J. R. Petri 將原 Robert Koch 之培養系統改良為一直徑 10-11 cm，深約 1-1.5 cm 之玻璃圓盤，其上蓋為一尺寸稍大的玻璃圓盤，其優點為操作時打開部份蓋子即可進行溶液的吸取，此外，玻璃圓盤加入溶液後相較玻璃板可以更容易利用搖晃之方式使其溶液分佈更為均勻 (Perti, 1887)。而 1907 年 R. G. Harrison 成功在體外利用無菌操作來培養蛙類的胚胎神經組織，並以蛙類自身之淋巴液作為培養基。培養方式是利用懸滴法（將組織及培養基放置於蓋玻片上，再其覆蓋於一有凹洞玻片之上，並封上蠟膜），在這樣的培養環境下，組織大多能存活一至兩週，藉由觀察其神經突起發展過程奠定細胞體外培養的基礎。此外，R. G. Harrison 亦發現在培養過程中胚胎神經組織有可能使其分化 (Harrison, 1910)。另外，1912 年 A. Carrel 在無菌操作之下培養心肌細胞及間質細胞，藉由定時更換培養基方式成功繼代上述之初代細胞且觀察其型態 (Carrel, 1912)（表



2-1)。由上述過往的研究得知，(1) 靜止式培養；(2) 定時更換合適的培養基（含有固體或液體形式的混合物）；(3) 於培養皿中能穩定保持細胞存活或分化，為目前實驗性細胞生物學研究的主流 (Nema and Khare, 2012)。

表 2-1 Historical background of animal cell culture (Nema and Khare, 2012).

Year	Significant work	Scientist
1885	Maintained embryonic chick cells in a saline culture	Roux
1897	Demonstrated the survival of cells isolated from blood and connective tissue in serum and plasma	Loeb
1907	Cultivated frog nerve cells in a lymph clot held by the “hanging drop” method and observed the growth of nerve fibers in vitro for several weeks	Harrisone
1911	First liquid media consisted of sea water, serum, embryo extract, salts and peptones	Lewis and Lewwis
1916	Proteolytic enzyme trypsin for the subculture of adherent cells	Rous and Jones
1923	T-flask as the first specifically designed cell culture vessel	Carrel and Baker
1948	Isolated mouse 1 fibroblasts which formed clones from single cells	Earle
1949	Polio virus could be grown on human embryonic cells in culture	Enders
1952	Continuous cell line from a human cervical carcinoma known as hela (helen lane) cells	Gey
1955	Nutrient requirements	Eagle
1964	Hat medium for cell selection	Littlefield

而 PDMS 微流道系統亦開始用於細胞培養上，其應用和一般微流道系統相同，是在微尺度下開發用於培養、維持、分析細胞實驗之設備和技術 (Hallforsson *et al.*, 2015)。相較一般以較宏觀方式 (Dish 培養方式) 進行細胞培養而言，微流道系統能控制且改變微環境以影響其細胞之表型。微流道系統中可利用控制層流流速等，使其改變微流道中細胞所受之剪切應力 (表 2-2)；且不同層流間不具對流之特性，使微流道系統可在細胞或亞細胞尺度下同時輸送多種可溶性分子，因此在體內有



較高灌流 (Highly perfused) 之器官/組織，如肝臟和腎臟，在微流道系統下培養可以更準確地模擬在其生物微環境中細胞與微血管網絡之緊密連結。而在微流道中培養亦可藉由持續控制供應/移除培養液來確保微環境實驗因子和營養長期的穩定，相比之下，靜態培養中可溶性實驗因子和營養等會隨著培養時間而被部份消耗，因此無法提供細胞培養的長期穩定性 (圖 2-5) (Kim *et al.*, 2007)。

微流道系統的另一優勢為其設計具有較高之靈活性，可以根據個體細胞類型的需求進行設計並測試；且以微流道系統來培養細胞，可將細胞的使用量大幅降低至幾百個細胞甚至單個細胞（一般培養皿下細胞培養大多含有 10^4 - 10^7 個細胞），進而有可能捕獲單個細胞之資訊。例如，可通過控制單一細胞的附著和移動更容易測量及觀察細胞運動中的動力學及機械特性 (Hallforsson *et al.*, 2015)。

在近幾年中，美國國家衛生研究院 (NIH)、食品與藥品管理局 (FDA)，歐盟架構計畫 (FP7)，及日本醫療研究開發機構 (AMED) 都開始針對微流道系統所建立之細胞晶片的研究投入大量的研究經費，也顯示世界各國對這類晶片的發展跟未來的應用具有高度之期望 (Wikswo *et al.*, 2013)。

表 2-2 Basic requirements for cell culture, and improvements when microfluidic methods are used (Mehking *et al.*, 2014) .

Requirements	Conventional cell culture	Microfluidic cell culture
Control of temperature and gasses	Large fluid volumes prevent fast changes	Small volumes allow dynamic control
Addition of nutrients and removal of metabolites	Infrequent, manual exchange of large volumes	Precisely measured, continuous or transient exchange of media
Stimulation with drugs/proteins and simultaneous imaging	Mostly not feasible	Feasible
Parallelization of cellular assays	Not feasible	High capability for parallelization
Automation of cell culture tasks	Bulky, expensive fluid-handling robots must be used	High capability for automation in compact, inexpensive format
Single-cell manipulation and analysis	Manually involved, inaccurate, low throughput	Accurate and high-throughput

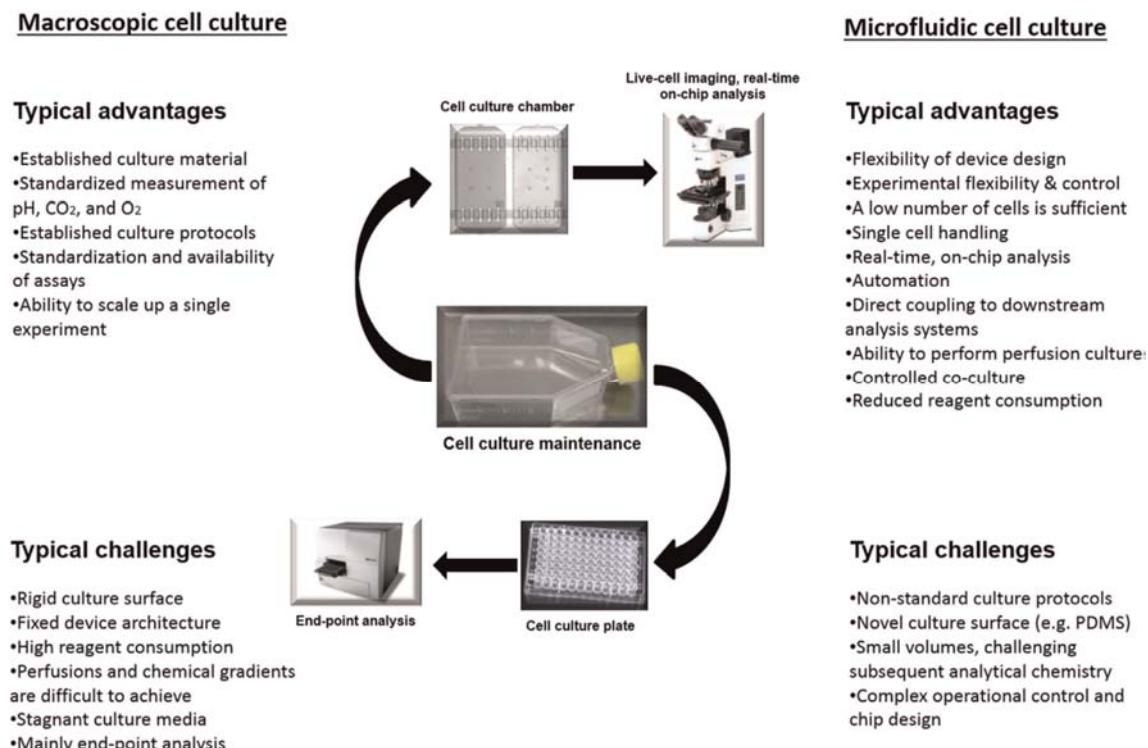


圖 2-5 Overview of advantages and challenges of both macroscopic and microfluidic cell culture (Kim *et al.*, 2007) .



2.8 PDMS 微流道系統應用於肝細胞培養

2007 年 Philip J. Lee 的團隊利用微流道結構來模擬體內養份的供給路徑：養分會先經過肝竇內皮細胞屏障後，才到達成熟肝細胞的情形（圖 2-6）。因此其微流道之設計初代肝細胞培養通道為 $50 \times 30 \times 300 \mu\text{m}$ ，而屏壁間寬 $2 \mu\text{m}$ ，其供培養基之擴散之孔隙為 $1 \times 2 \mu\text{m}$ ，流速為 10 nL/min ，此流動擴散系統可使初代肝細胞即便在沒有修飾膠原蛋白之流道表面下培養 7 天後仍能維持 $94 \pm 15\%$ 之生存率。其後，P. J. Lee 團隊利用此微流道系統測試雙氯芬酸 (Diclofenac，為一發炎抑制劑) 之肝毒性，結果顯示在加入藥品並培養 4 小時後對肝細胞並沒有顯著的肝毒性，但在藥物作用 24 小時後其 IC_{50} 為 $334 \pm 41 \mu\text{M}$ 。此研究成功以微米級培養系統來模擬肝血竇之質量傳遞性質，如組織和流體的運輸區域以及連續的營養物交換等。此外，初代大鼠和人類肝細胞在此裝置皆能維持超過 7 天之生存率 (Lee *et al.*, 2007)。而這平台使用之細胞量較傳統培養皿所需的細胞量少約 100 倍，因此在相同的細胞量下，可以使用此平台做更大量之藥物測試。

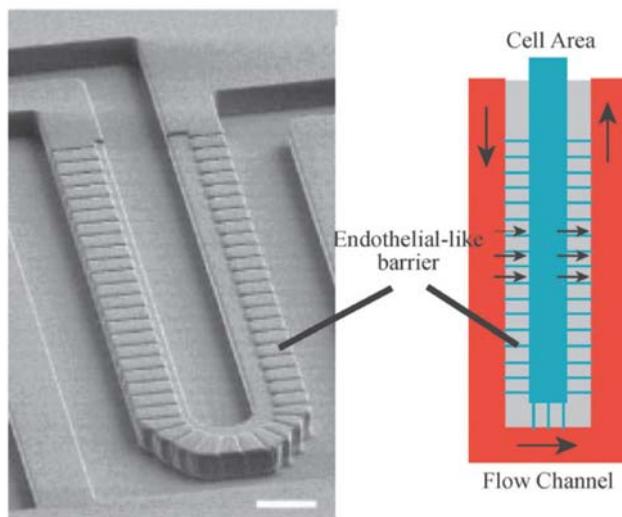


圖 2-6 Microfluidic endothelial-like barrier properties (Lee *et al.*, 2007).



2010 年 Chien-Yu Fu 與其團隊在微流道上以 U-Shape 之設計將肝癌細胞三次元球 (HepG2 Spheroid) 限制在流道內進行 3D 培養 (圖 2-7) ，因細胞三次元球能提高 cell-cell interaction ，因此其功能和結構會與真實體內組織較為相似。而一般製作細胞三次元球方式為利用細胞懸滴法、或透過在不易讓細胞黏附的培養皿中培養細胞，進而產生此三次元球，然而三次元球由於是懸浮在培養液中，所以容易在培養基交換時而一併流失。此研究利用 U-Shape 之設計來改善細胞三次元球在微流道中會隨培養液交換而離開微流道系統的劣勢，藉由 U-Shape 的形狀來固定住培養中的三次元球，因此相較於傳統的懸滴法能作更長時間培養，此外，細胞三次元球之尺寸亦能根據 U-Shape 之大小來微調。 U-Shape 的厚度約為 $100 \mu\text{m}$ ，內部空間為 $250 \times 200 \times 700 \mu\text{m}$ ， 將肝癌細胞液 (HepG2 cell suspension) 以 $8.4 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 之密度， $2 \mu\text{L/min}$ 流速下注入此微流道系統中，5 分鐘後將培養液注入，以洗脫未捕獲在 U-Shape 中之殘留於微流道中的 HepG2 。其系統最後流速為 $2 \mu\text{L/min}$ 。此研究接著利用阿黴素 (Doxorubicin，為一種使 DNA 發生嵌入作用及為拓撲異構酶抑制劑) 來測試此平台是否可做藥物測試平台，並由結果得知，相較 HepG2 在 2D 培養下結果 (以 $3.0 \mu\text{g/mL}$ 作用 HepG2 兩天後即大多數凋亡) ，肝癌細胞三次元球在濃度 48 及 $96 \mu\text{g/mL}$ 的藥物環境下作用五天，其代謝活性仍然與藥物處理前相同，證明肝癌細胞三次元球之耐藥物能力相較 2D 培養有所上升。這樣的結果表示 3D 培養系統在腫瘤藥物篩選中的重要性，也證明常規藥物在此微流道系統中進行分析與探討是可行的，並且由於此裝置能讓細胞簡易形成細胞三次元球，所以比起其他微流道的設計更能長時間進行培養。

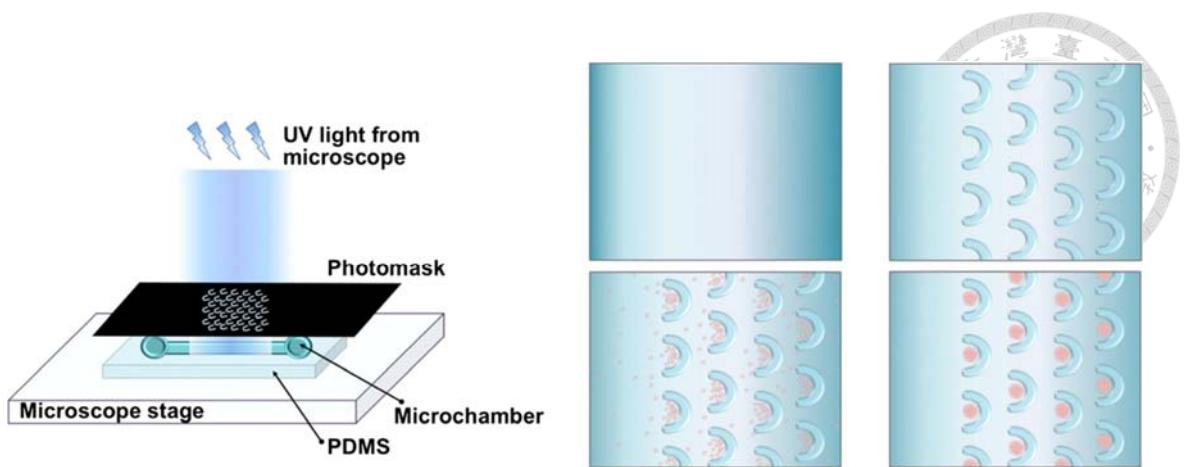


圖 2-7 The flowchart of U-shaped microstructure fabrication, cell trapping and spheroid formation (Fu *et al.*, 2010).



在臺灣清華大學劉承賢教授的團隊以介電泳式的細胞分離技術 (Dielectrophoresis Force, DEP) 應用於微流道晶片中之細胞排列，進一步模擬出肝小葉中之細胞排列情況 (圖 2-8)。此裝置是將 HepG2 及人類臍靜脈內皮細胞株 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVECs) 於流道中進行共培養，在晶片製作的過程中設計兩種不同圖樣的電極，在兩種不同之細胞注入時分別施加電場，使其能分別吸附在微流道上原先所設計之位置，最後成功透過介電泳使細胞能分別排列成為類肝小葉中細胞之分佈。而透過介電泳的排列後，細胞仍然 95 % 的生存率，證明介電泳分離下對其生存率無顯著影響。實驗結果亦顯示利用介電泳來模擬肝小葉排列，和未經排列的細胞相比之下，在培養兩天之後 CYP 1A1 的活性提高了約 80 %，此結果不僅證明細胞間分泌之物質會影響其生長及活性之外，細胞的活性與機能在不同排列方式下亦會有不同的表現。

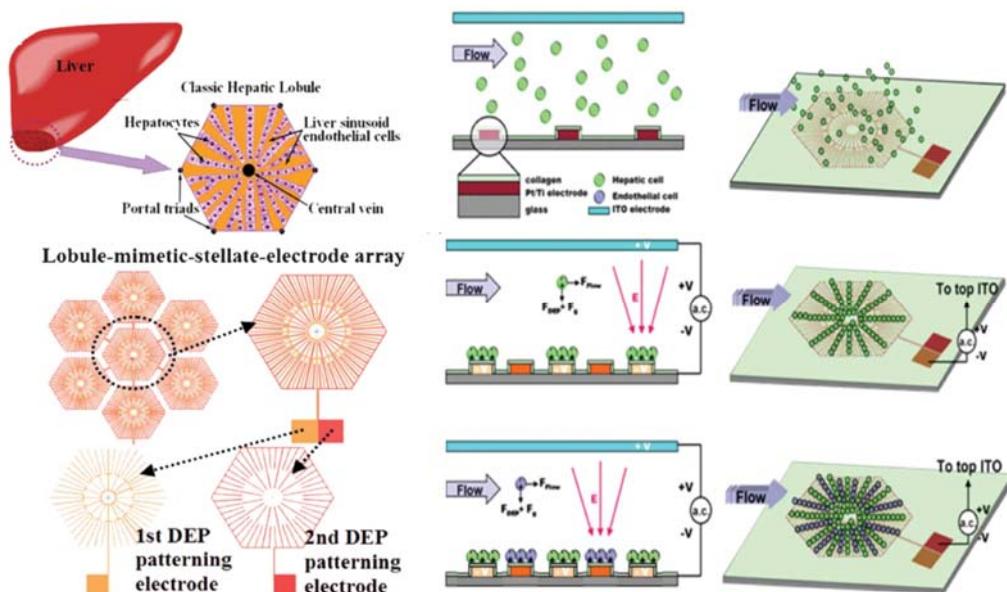


圖 2-8 Liver-cell patterning Lab Chip: mimicking the morphology of liver lobule tissue (Liu *et al.*, 2013).



Ljupcho Prodanov 之哈佛團隊，成功透過雙層 PDMS 微流道系統來模彷肝臟中不同細胞之分佈情形。於此系統下，肝細胞能夠維持 28 天的活性及機能，相較於一般培養皿環境下培養的單層肝細胞只能維持 7 天之生長，肝細胞在此系統培養後有顯著的活性及機能提升。此系統設計為雙層 PDMS 結構，中間以聚對苯二甲酸乙二酯 (Polyethylene terephthalate, PET) 之多孔通透膜來區隔，同時將四種細胞共培養於微流道上：分別為人類初代肝細胞、人類臍靜脈內皮細胞株 (EA.hy926 cell)、人類巨噬細胞株 (U937) 及人類肝臟星狀細胞株 (LX-2 cells)。其注入細胞之步驟為：先注入人類初代肝細胞靜置一天使其貼附於最下層微流道之玻璃上，再接著注入與膠原蛋白水膠混合之 LX-2 於下層微流道中，並將晶片翻轉放置一天，以增加 LX-2 於水膠中的分佈深度。之後再注入 EA.hy926 於上層微流道中，在晶片培養七天後注入 U937 於前述相同的上層微流道中（圖 2-9）。由結果可以發現：(1) 肝細胞在體外培養可長達 28 天；(2) 在流動的系統中可維持良好的肝臟機能（白蛋白和尿素之分泌量）；(3) CYP3A4 的代謝活性可以維持。由此研究結果可以確認 Liver-on chip 在體外長期培養的可能性，也使我們可以更進一步了解藥物在人類肝臟系統中所產生的藥物代謝反應，也為 Liver-on chip 在藥物檢測平台的應用下有著極高的發展潛能。

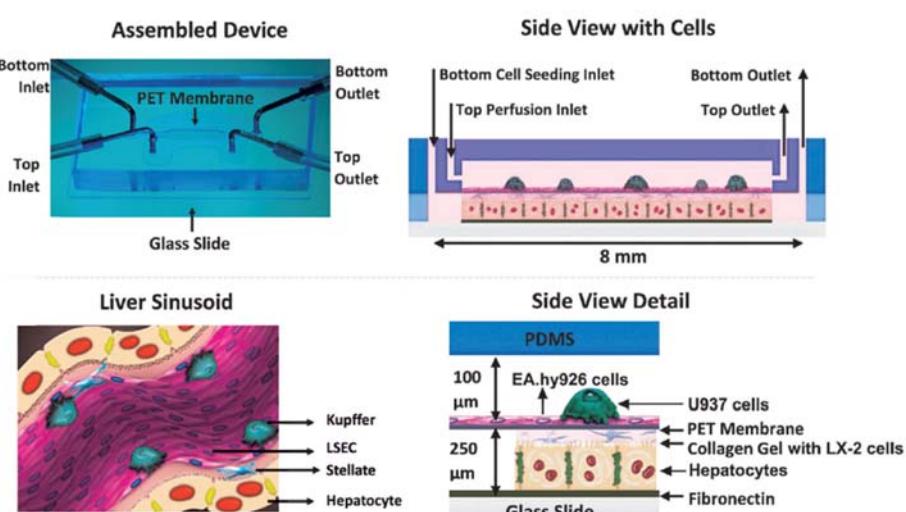


圖 2-9 Long-term maintenance of a microfluidic 3D human liver sinusoid (Prodanov et al., 2016).



2.9 Poly(methyl methacrylate)微流道系統

聚甲基丙烯酸甲酯 (Poly(methyl methacrylate) ,PMMA) 亦是微流道系統中常被用來當成基底的聚合物。其優點為價格相較低廉、具有優異的光學透明性和優異之電及機械性質、且在外加電場條件下亦能在微流道中產生穩定的電滲流 (Electro-osmotic flow , EOF) (Becker and Locascio, 2002) 。除此之外，它亦是常用的塑料材料中疏水性較低之聚合物 [接觸角為： 66° - 71° (Rinken, 2009)]，由於可在高溫下分解成甲基丙烯酸甲酯 (Methyl methacrylate , MMA) ，因此 PMMA 可重複使用，所以 PMMA 亦是製備「綠色晶片」之潛在材料。

2.9.1 PMMA 微流道系統製作

2.9.1.1 热壓法 (Hot embossing)

熱壓法是用於 PMMA 微通道製作之最常使用方法。將一塊 PMMA 平板置於熱壓系統，系統中以矽或金屬作為微流道結構模具之基材，將該系統加熱至 105°C 以上 (105°C 為 PMMA 玻璃化轉變之溫度)，之後以壓印 (壓力大小為 20-30 kN) 之方式將設計之微流道結構壓印於 PMMA 上，再持續加壓 20-30 秒後停止加熱，最後直到模具及 PMMA 之溫度下降到 105°C 以下即可脫模完成微流道系統製作 (圖 2-10) (Becker and Heim, 2000) 。

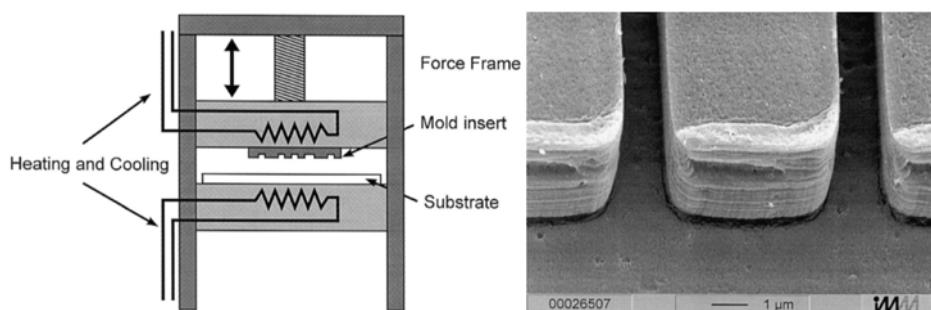


圖 2-10 Schematic drawing of the hot embossing equipment and Replication of this structure in PMMA (The channels are 0.8 mm wide.) (Becker and Heim, 2000) .



2.9.1.2 室溫壓印 (Room-temperature imprinting)

此方法利用光阻於矽晶原上蝕刻出想要設計的微流道結構模具，並將有微流道結構之矽模具固定於鋁板上，再將 PMMA 固定於另一上，利用液壓機在室溫下施加 450 至 2700 psi 之壓力並持續約 5 分鐘即可完成（圖 2-11）。此方法可以避免壓印過程中加熱模具造成模具形變，此外，每一模具能製作之工件產量亦可從 10 個器件提高至 100 個工件以上，且工件間流道之尺寸變化小於 2 % (Xu *et al.*, 2000)。

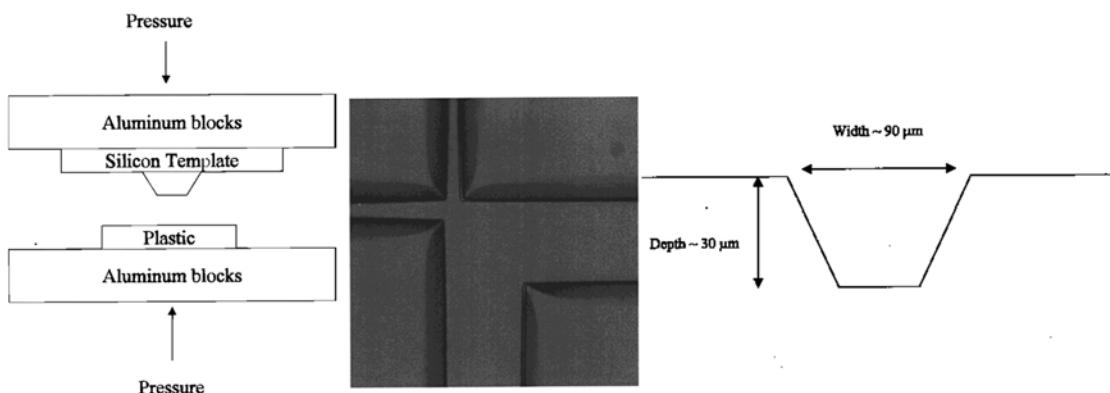


圖 2-11 Room-temperature imprinting of microfluidic channels using silicon template, microscopic images of top view and cross section of an imprinted PMMA device (Xu *et al.*, 2000).

2.9.1.3 雷射雕刻 (Laser ablation)

此方法通常使用市售的雷射雕刻機來雕刻 PMMA 基板，它由準分子雷射 (Excimer Laser) 和放置 PMMA 基板的平台組成（圖 2-12）。平台在 2D 區域上可進行 X 和 Y 方向之運動，並利用高能量之雷射以破壞 PMMA 聚合物分子間的鍵結，並從消融區域中去除分解的碎片形成通槽，我們亦可調整雷射之強度以改變刻出流道之深度。此平台可使用通用繪圖工具（如 CorelDraw 或 AutoCAD）設計圖案，然後將圖案發送到系統後於 PMMA 基底上直接加工 (Cheng *et al.*, 2004)。

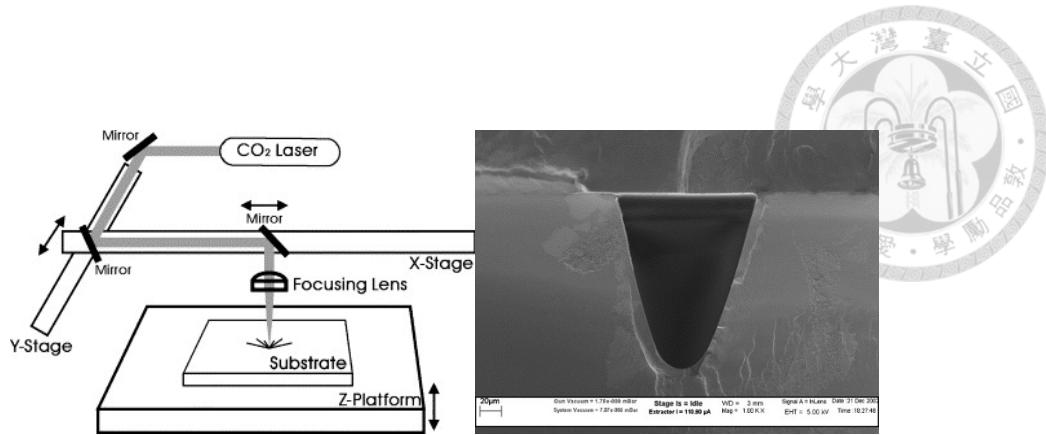


圖 2-12 Configuration of a direct-write laser machining system and SEM image of the cross-section of an unsealed laser machined microchannel (Cheng *et al.*, 2004) .



2.9.1.4 溶劑蝕刻 (Solvent etching)

使用已預先有微流道之 PDMS 作為模板，再將其與 PMMA 黏合後，在 PDMS 微流道中注入並充滿有機蝕刻溶劑 [有機蝕刻溶劑為丙酮和乙醇 (1:1) 之混合] (圖 2-13)。此方式能在數分鐘內將原 PDMS 設計之流道複製於 PMMA 上形成平滑的通道表面，且 PMDS 模板可供多次使用。這種新穎的方法提供了另一用於在 PMMA 基板上快速製造微流道的方法 (Brister and Weston, 2005)。

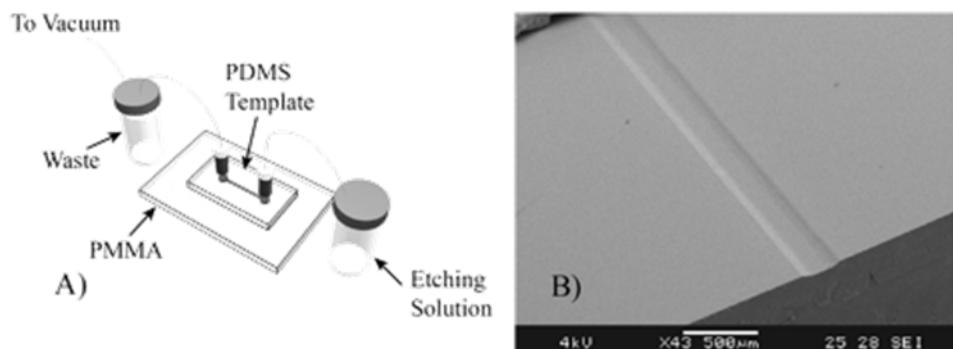


圖 2-13 Schematic of the etching process and representative analysis of an etched channel by SEM (Brister and Weston, 2005).



2.9.2 PMMA 微流道系統黏合

2.9.2.1 热黏合 (Thermal bonding)

將 PMMA 底板及上蓋與封裝在其內部的微結構組合在一起，並在對流烘箱中加熱到高於 PMMA 的玻璃化轉變溫度 (105°C)，之後並接著施加正壓到上述的底板及上蓋，以進一步來黏合兩 PMMA。這些黏合過程需要約 1 小時才能完成，並在 130-150 千帕範圍內之壓力下進行。但過程中由於會採用高於玻璃化轉變溫度的條件，有可能導致通道造成形變進而影響其製程再現性 (Xu *et al.*, 2000)。

2.9.2.2 溶劑黏合 (Solvent bonding)

利用旋轉塗佈機以 4500 rpm (2.5 秒) 將 2,4- 戊二酮覆蓋於 PMMA 底板上，之後將其與有微流道設計之 PMMA 上蓋進行組合，並用手在表面施加正壓 2 分鐘 (Wang *et al.*, 2007)；另一方式為先將上下基板浸入丙酮中 10 秒以清潔它們的表面，再以乾淨的空氣將基板吹乾，之後在加入 3-5 滴 DE-20 (20 %wt 之 1,2-dichloroethane 與 80%wt ethanol 混合) 於兩 PMMA 基底的接觸面上，並使溶劑能均勻分佈在整個接觸表面區域，最後再以 C 型夾或壓印機在室溫下對此兩個需結合的 PMMA 底板施加約 10 N/cm^2 壓力 5 分鐘即可完成黏合 (Lin, Chao and Lan, 2007)。

2.9.2.3 微波黏合 (Microwave bonding)

PMMA 由於對 2.4 GHz 頻帶附近之微波無明顯之吸收峰，因此可以在兩 PMMA 基板界面上覆蓋一薄膜金屬。由於在外加微波時大部分微波能量會被界面處的薄膜金屬吸收，導致在兩 PMMA 界面中加熱高於 PMMA 的玻璃化轉變溫度之後，再以加壓的方式使其黏合 (Lei *et al.*, 2004)。



另一方式是將乙醇覆蓋於兩 PMMA 底板間使其均勻分佈而沒有殘留的空氣後，用活頁夾夾緊兩 PMMA 板，之後再將多餘乙醇擦拭後，並進一步將緊密捲起的 Kimwipe 放置在其中一個流道末端，最後藉由毛細作用吸出流道中之乙醇以避免流道封死。PMMA 放置在通風櫥下的商用微波爐中以功率 700 W 下運行 30 至 90 秒即可完成黏合（圖 2-14）(Rahbar *et al.*, 2009)。

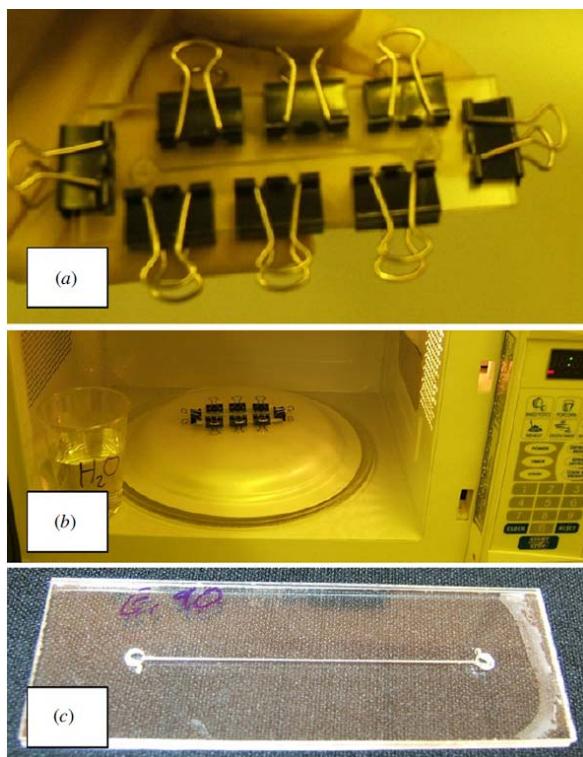


圖 2-14 Picture of the bonding setup (a) PMMA channels with clips and alcohol, (b) PMMA and water placed in a commercial microwave just before bonding, (c) bonded microfluidics (ethanol, 90 s) showing over 90% bonded area (Rahbar *et al.*, 2009).

因此，本研究擬以利用能快速製程的 PMMA 微流道 (Rahbar *et al.*, 2009)，結合分化效率高之肝前驅細胞 (Lee *et al.*, 2015)，以建立一個新型的 Liver-on-chip 做為肝細胞培養平台，並分於平台上培養的肝前驅細胞機能並生長型態，與培養在 Dish 上的細胞進行比較。



第三章 試驗設備與方法

3.1 實驗藥品、耗材、儀器設備與實驗動物

3.1.1 實驗藥品

Chloroform (288306) 、L-Ascorbic acid (A8960-5G) 、L-Proline (P0380-100G) 、 Dexamethasone (D4902-100MG) 、 Picrylsulfonic acid solution (P2297-10ML) 、 Hydrochloric acid (30721-1L) 、 Ethanol (32221-2.5L) 、 Acetone (32201-2.5L) 購於 Sigma-Aldrich 。 2-Propanol (29113-95) 、 Nicotinamide (24317-72) 、 Albumin, Bovine Serum (08587-42) 、 NaCl (31320-05) 、 KCl (28514-75) 、 NaH₂PO₄-2H₂O (317-18) 、 Na₂HPO₄-12H₂O (31723-35) 、 Phenol red (26807-21) 購於 Nacalai 。 Trypan blue 0.4% (207-17081) 、 Collagenase (034-22363) 購於 Wako 。 TRIzol® Reagent (15596018) 、 FBS (26140-079) 、 Penicillin-Streptomycin (15140-122) 、 ReadyProbes® Cell Viability Imaging Kit (Blue/Green) Protocol (R37609) 、 Cytokeratin 18 Antibody (MA1-06326) 、 Goat anti-Mouse IgG Antibody (A-11001) 、 UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water (10977-015) 、 ITS (51500-056) 、 Goat anti-Rabbit IgG Antibody (A11012) 、 ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI (P36931) 、 HEPES (172571000) 購於 Thermo Fisher Scientific 。 PrimeScriptTM^{1st} stand cDNA synthesis kit (6110A) 購於 TaKaRa 。 Rotor-Gene® SYBR® Green PCR master mix 2× 購於 QIAGEN 。 Cellmatrix type I-A 3 mg/mL (Collagen) (160222) 購於新田ゼラチン。 透明藍光固化膠 (Liquid acrylic resin) (0916) 購於 BLUFIIXX 。 QuantiChrom™ Urea Assay Kit (DIUR-100) 購於 BioAssay Systems 。 Rat Albumin ELISA Quantitation kit (E110-125) 購於 Bethyl 。 DMEM/F12 (CC113-0500) 、 WE medium (CC901-0500) 、 DMEM (CC103-0500) 購於 Simply GeneDireX 。 EGF (354001) 購於 Corning 。 Primer for qPCR 購於 LGC Biosearch Technologies 。 Cytokeratin 19 Antibody (10712-1-AP) 購於 Proteintech 。



3.1.2 儀器設備

超音波震盪機 (Q125) 購於 QSONICA 公司。注射幫浦 (KDS230) 購於 KD Scientific® 公司。送液幫浦 (MP-2000; SMP-23s) 購於 EYELA 公司。離心機 (5840R) 、8 噴嘴 pipettes (3122000035, 3122000051) 、Pipettes (310000046, 310000054, 3120000062) 購於 Eppendorf Researche 公司。Microplate Absorbance Reader (Ref.16039400) 購於 TECAN 公司。倒立式相位差顯微鏡 (Axio Vert.A1) 購於 Carl Zeiss。冷凍離心機 (5840R) 購於 Eppendorf Research。TurboCycler 梯度核酸擴增 PCR 儀 (TCST-9610) 購於 Blue-Ray Biotech。qPCR 機器 (Rotor-Gene Q) 購於 QIAGEN。微量盤式分光光度計 (Epoch) 、Take3™ Trio Micro-Volume plates 購於 BioTek。Forma Steri-Cycle CO₂ Incubators (370) 、Biological Safety Cabinet (1300A2) 、S1 Pipet Fillers (9501) 、純水製造裝置 (50132373) 、Compact Digital Microplate Shaker (88880023) 、Countess II FL Automated Cell Counter、Cytospin™ 4 Cytocentrifuge 購於 Thermo Fisher Scientific。超音波洗淨機 (T 840 DH) 購於 ELMA。HARRICK PLASMA Cleaner 氧電漿清洗機 - 基本型 (PDC-32G) 購於 HARRICK PLASMA。

3.1.3 實驗耗材

15 mL 減菌離心管(339650) 、50 mL 減菌離心管 (339652) 、Nunc™ Cell Scrapers (179693) 購於 Thermo Fisher Scientific。96 孔 ELISA 盤 (Elisa-PS-96F-F-H) 購於 Advangene。Costar® Stripette® 10 mL Polystyrene Sterile Serological Pipets (4488) 、Costar® Stripette® 50 mL Polystyrene Sterile Serological Pipets (4490) 、Falcon® 70 µm Cell Strainer (352350) 、Falcon® 100 µm Cell Strainer (352360) 購於 Corning。載玻片 silane coating (5116) 購於 Muto Pure Chemicals。Individual PCR Tubes (3220-00) 購於 SSI bio。



3.1.4 實驗動物

Sprague Dawley 大鼠購於國家實驗動物中心。本研究涉及實驗動物使用由台灣大學實驗動物照護及使用委員會所認可，而實驗者擁有台灣大學 A10、B10、D4、E5、E6 的教育訓練合格證書。

3.2 細胞懸浮液組成分析

利用 Cytospin™ 4 Cytocentrifuge 以 500 rpm，4 分鐘之離心速度將細胞密度為 1.5×10^4 cells/mL 之細胞懸浮液分佈在載玻片之固定區域後將其放置晾乾，再以 -20 °C 之 Acetone 固定 5 分鐘，之後再將其浸泡在 PBS 中洗淨 5 分鐘。將其拭乾後再以 1 % BSA (溶於 PBS 中) 滴在載玻片上 (約 0.1 mL) 放置於 37 °C 下反應 1 小時並拭乾。之後將 1 次抗體 (1:100 之稀釋倍率將抗體溶於 PBS 中) 滴在玻片上放置於 37 °C 下反應 1 小時，接著以 PBS 洗淨 10 分鐘並重覆 3 次，拭乾後再將 2 次抗體 (1:100 之稀釋倍率將抗體溶於 PBS 中) 滴在載玻片上放置於 37 °C 且避光之環境下反應 1 小時後，最後以 PBS 洗淨 10 分鐘並重覆 2 次，再接著以 PBS 洗淨 20 分鐘，將其拭乾後滴入 Mountant with DAPI 並以蓋玻片蓋上完成封片。上述每個階段所使用的 PBS 都是一次性使用。

3.3 膠原蛋白修飾培養皿製備

利用 0.1 M HCl 將膠原蛋白原液稀釋 30 倍 (成為 0.1 mg/mL) 後，取出其中的 2 mL 膠原蛋白稀釋溶液加入於 60mm Petri dish 內，確定溶液完全覆蓋培養皿表面後置於 37 °C 下過夜。使用前將溶液抽出，以 PBS 沖洗 2 次後即可使用。



3.4 肝細胞採取與培養

初代肝實質細胞（成熟肝細胞）及小型肝細胞的採取皆利用 Two-step collagenase perfusion (Seglen, 1976) (圖 3-1) 的方式取得。初代肝細胞及小型肝細胞在分離過程中所使用的 Collagenase 量分別為 50 mg 及 66 mg，且皆溶於 50 mL Buffer B (NaCl 16.013 g, KCl 0.805 g, NaH₂PO₄-2H₂O 0.156 g, Na₂HPO₄-12H₂O 0.301 g, HEPES 4.766 g, Phenol red 0.012 g, NaHCO₃ 0.353 g, 溶於 2 L 之二次水中，並用濃度為 1 N 的 NaOH 調整成 pH 7.5)。

成熟肝細胞的分離步驟為：將肝臟取出，並置於 90 mm dish 裡再加入 WE medium (以下所示的 WE medium 皆有 5 % FBS 及 1 % Penicillin-Streptomycin) 來浸潤整個肝臟，之後用 2 隻解剖刀以平行下刀的方式將肝臟切碎，接著再以適當的 Pipetting 將肝細胞懸浮液混合均勻，最後將此懸浮液以 7 cm × 7 cm 的消毒滅菌紗布濾過至 50 mL 的離心管中 (分注成兩管)，再以 100 μm 的 Cell strainer 濾過肝細胞懸浮液至新的 50 mL 的離心管中 (分注成兩管)，兩管皆以 WE medium 裝滿至 30-40 mL，接著再以 50 g、1 分、4 °C 的條件下離心，並將兩管上清液的部分吸出並放至於新的 50 mL 的離心管中 (供之後的小型肝細胞採取所使用)。上清液取出後留下的沉澱物即為成熟肝細胞的 Cell pellet，我們接著加入 30-40 mL 之 WE medium 至離心管與 Cell pellet 均勻混合後以 50 g、1 分、4 °C 的條件下離心，離心完後再將上清液吸出保留於新的 50 mL 的離心管中 (供之後的小型肝細胞採取所使用)。留下的成熟肝細胞 Cell pellet 再分別加入 20 mL WE medium 至兩個 50 mL 的離心管中均勻混和後，將 2 管的懸浮液整合為 1 管，再進行第三次的 50 g、1 分、4 °C 離心，離心完後將上清液吸出保留於新的 50 mL 的離心管中 (供之後的小型肝細胞採取所使用)，留下的成熟肝細胞 Cell pellet 再分別加入 10 mL WE medium 至離心管並均勻混合，最後即可得到初代肝實質細胞的懸浮液 (Cell suspension)。



而 2007 年 Chen, Q 及其團隊之小型肝細胞的分離步驟如下 (Chen et al., 2007)：取得成熟肝細胞的情況下之離心後上清液（也就是上段內容中所分別取得的三次上清液），先以 $70\text{ }\mu\text{m}$ 的 Cell strainer 濾過後，濾過後的細胞懸浮液接著移置新的 50 mL 的離心管中（共四管），再以 50 g 、 1 分、 4°C 之條件下離心將上清液吸出保留於新的 50 mL 離心管後，再將這些上清液以 50 g 、 5 分、 4°C 之條件下離心將上清液去除只留下小型肝細胞的 Cell pellet。之後加入 $30\text{-}40\text{ mL}$ 之 WE medium 至離心管與小型肝細胞的 Cell pellet 均勻混合後，再以 50 g 、 5 分、 4°C 離心後將上清液去除，剩下的小型肝細胞 Cell pellet 之後以 WE medium 填滿至 40 mL 。再以 150 g 、 5 分、 4°C 離心，將上清液吸出保留於新的 50 mL 離心管後，接著以 150 g 、 5 分、 4°C 離心，再一次上清液吸出保留於新的 50 mL 離心管後，最後將上清液整合為 2 管，以 50 g 、 5 分、 4°C 離心。之後將上清液去除後，剩下的小型肝細胞的 Cell pellet 再加入 5 mL DMEM/F12，並均勻混合整合為 1 管後即可得到小型肝細胞懸浮液。

本研究所用之小型肝細胞參考上述 2007 年 Chen, Q 之分離步驟，並稍做調整：將取得初代肝實質細胞的情況下之離心後上清液（也就是上上段內容中所分別取得的三次上清液），先以 $70\text{ }\mu\text{m}$ 的 Cell strainer 濾過後，濾過後的細胞懸浮液接著移置新的 50 mL 的離心管中（共四管），再將這些上清液以 50 g 、 1 分、 4°C 之條件下離心後，將上清液吸出保留於新的 50 mL 離心管，再以 150 g 、 5 分、 4°C 離心後將上清液去除，並將四管沉澱的小型肝細胞的 Cell pellet 整合為 1 管。接著以 WE medium 填滿至 40 mL 後，再以 150 g 、 5 分、 4°C 離心。之後將上清液去除後，剩下的小型肝細胞 Cell pellet 再加入 5 mL DMEM/F12，並均勻混合即可得到小型肝細胞懸浮液。最後利用 Trypan blue 染色來計算細胞生存率。

將上述採集而成的 5 mL 的細胞懸浮液（初代肝細胞密度為： 2×10^5 cells/mL；小型肝細胞密度為 3×10^5 cells/mL），分別培養於有修飾膠原蛋白（濃度為 0.1 mg/mL ）之 60 mm Petri dish，並於 37°C ， 5% CO_2 的培養箱內，小



型肝細胞以 DMEM/F-12 medium; 成熟肝細胞以 WE medium 進行培養。培養 4 小時後換培養液，之後每隔二天更換一次培養液，並於倒立式相位差顯微鏡下觀察其細胞型態。而小型肝細胞的長時間培養，則會利用在 Dish 上的標記來固定位置觀察細胞（圖 3-2），而成熟肝細胞由前人研究指出 (Choi and Diehl, 2009; Zeisberg *et al.*, 2007) ，其生長時間約只有一週，因此未採以固定位置觀察細胞。

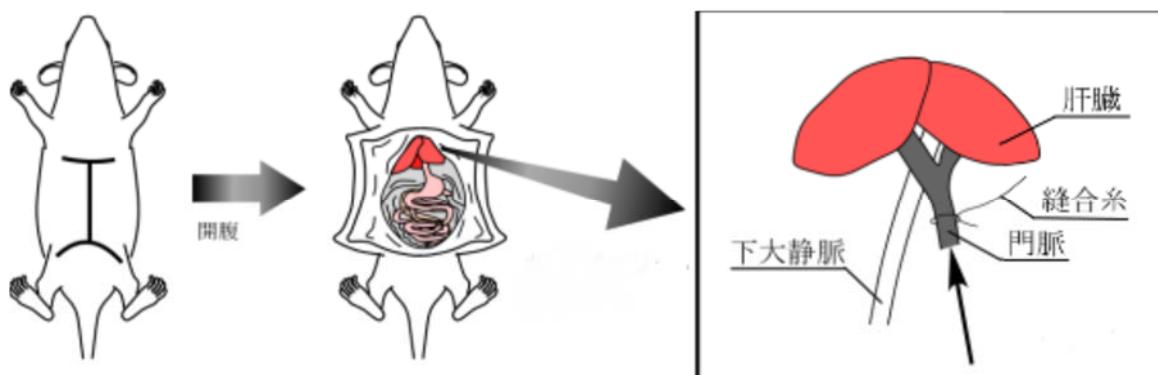


圖 3-1 Two-step collagenase perfusion 示意圖

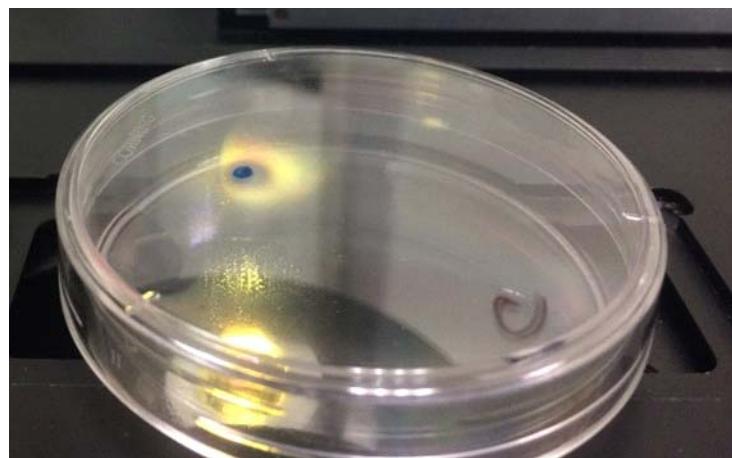


圖 3-2 在 Dish 上的標記來固定位置觀察小型肝細胞之實際情況。

3.5 肝細胞於經光固化膠處理的 PMMA 上進行培養

塗有光固化膠之 PMMA 之製作方式為：將約 0.2 mL 之光固化膠塗於 1 mm 厚的 PMMA 上，放置一天後將其置於 60 mm dish 中，再接著以 5 mL PBS 沖洗



3 次以洗淨 PMMA。而無處理的 1 mm 厚 PMMA 亦置於 60 mm dish 中，並接著以 5 mL PBS 沖洗 3 次以洗淨 PMMA。

最後，我們接著以相較於小型肝細胞較易取得且培養的成熟肝細胞，先對有無光固化膠的 PMMA 進行細胞活性測試，以確認此材料是否容易讓肝細胞貼附生長。將 5 mL 的成熟肝細胞懸浮液（密度為： 2×10^5 cells/mL）加入於 Dish 中，放置於 37 °C，5 % CO₂ 的培養箱內，養 4 小時後換培養液、一天後再一次更換培養液，並於倒立式相位差顯微鏡下觀察其細胞型態。

3.6 PMMA 微流道晶片製程及細胞培養

以 5 mm 厚之 PMMA 做為上蓋，且以委託佳興國際科技有限公司以雷射雕刻之方式來製作我們設計的微流道（如圖 3-3 所示）。PMMA 兩開口以 1/4"-28 之絲攻來攻出螺牙，而 PMMA 在黏合前會將其浸泡在以 Acetone 和 Ethanol 比例為 1:1 混合之溶液，並施行超音波震盪 5 分鐘，之後再以 Ethanol 浸泡並施行超音波震盪 5 分鐘，最後再以微波黏合方式使之與一厚度為 1 mm 之 PMMA 黏合。兩 PMMA 基板之黏合操作步驟具體如下：先將兩 PMMA 接觸面沾滿 Ethanol，接著將兩 PMMA 以文件夾夾緊後，在其中一開口處以 Kimwipe 將微流道中 Ethanol 以毛細現象的方式吸取，使微流道中無殘存的 Ethanol，其目的為了防止 PMMA 在黏合過程中將流道封閉。最後將以文件夾夾緊之 PMMA 放入市售微波爐中以 700 W 之功率加熱 40 秒。

上述已黏合之 PMMA 晶片再接著利用 HARRICK PLASMA Cleaner 以 High power (30 W) 下處理 5 分鐘以進行 Plasma 的修飾。之後再注入 0.5 mL 的 Ethanol、並接著注入 0.5 mL 的 PBS 以洗淨 PMMA 晶片。洗淨後再注入 0.1 mL 的 0.3 mg/mL 及 0.1 mg/mL 的膠原蛋白稀釋液（以 PBS 稀釋），並放置於 37 °C，5 % CO₂ 的培養箱中過夜。在注入細胞前再以 0.5 mL 的 PBS、0.5 mL 的 DMEM/F12 洗淨 PMMA 晶片，洗淨完畢後將 0.1 mL 小型肝細胞懸浮液（密度

為： 10^6 cells/mL) 注入，靜置培養 4 小時後，利用液壓差方式將 DMEM/F12 注入微流道中以利細胞培養。

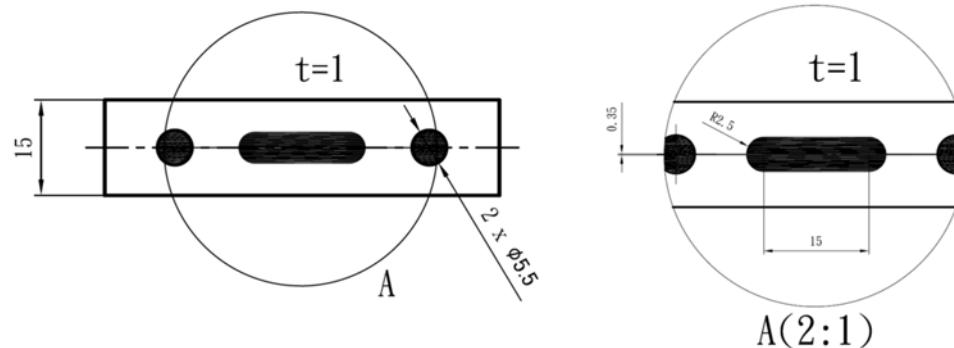


圖 3-3 PMMA 微流道之設計 (單位 : mm) 。

3.7 實驗相關檢測方法

3.7.1 免疫螢光染色

細胞活性檢測方式是將小型肝細胞於 Dish 上培養 12 天與 35 天後及小型肝細胞於 PMMA 流道和 Dish 上培養 1 天後，利用 ReadyProbes[®] Cell Viability Imaging Kit 對細胞進行免疫螢光染色，並於倒立式螢光顯微鏡下觀察其螢光表現，而 PMMA 流道和 Dish 上培養 1 天後之結果，則利用 Image J (版本為 1.52d，National Institutes of Health) 中的 Cell counter 計算細胞生存率；細胞特徵抗原檢測方式為小型肝細胞於 Dish 上培養 1 天、3 天、8 天、15 天後，利用 ReadyProbes[®] Cell Viability Imaging Kit 中的 DAPI (細胞核的標示劑) 及 CK18 (成熟肝細胞的表面特徵抗原之抗體) 對細胞進行免疫螢光染色，並於倒立式螢光顯微鏡下觀察其螢光表現。

3.7.2 白蛋白 (Albumin) 分泌量檢測

檢測方式採用酵素免疫測定法 (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay，ELISA)，利用特定的一次抗體與樣品中之待測物 (抗原) 結合，再利用對一次抗體有辨識力之帶有酵素之二次抗體結合以呈色檢驗待測物質濃度。本實驗使用 Rat



albumin standard 和 Anti-rat albumin antibody 製作檢量線，並採用蛋白質檢測試劑 ELISA kit HRP substrate 進行檢測。最終待測物在微量盤式分光光度計下測量 450 nm 的吸光值，通過檢量線計算出分泌量 (Hou *et al.*, 2012)。最後結果會以 t-test 做統計學分析，小型肝細胞的 Day 3、Day 6、Day 9、Day 15、Day 21 的結果與 Day 1 的結果作比較來分析；而成熟肝細胞的 Day 3、Day 5、Day 7 的結果與 Day 1 的結果作比較來分析。

3.7.3 Quantitative real-time PCR (qPCR)

小型肝細胞於 Dish 上培養 3、7、14 天後分別用 TRIzol[®] 萃取出小型肝細胞的 RNA。將其反轉錄成 cDNA，最後利用 qPCR 分別針對 Actin(細胞骨架)、Albumin(肝細胞機能)、CYP1A2(肝細胞機能)、CYP3A4(肝細胞機能)、Follistatin(小型肝細胞的 Marker)、Tryptophan 2,3-dioxygenase(TO，成熟肝細胞的 Marker)之相對表現量進行檢測並分析。

qPCR 具體操作步驟如下：首先將加入 1 mL TRIzol[®] 加入培養皿後並於室溫下以 Shaker 震盪 5 分鐘，再以 Cell scraper 將細胞盡可能地刮離培養皿表面並收集於 1.5 mL Eppendorf tube，接著再加入 0.2 mL CHCl₃ 至 Tube 裡並搖晃使其混合。靜置 5 分鐘後，再進行 12000 rpm、15 分鐘、4 °C 離心，離心後可以觀察到分層，而其中 RNA 位於水相層中。我們抽取 0.35-0.4 mL 水相層的溶液並置於新的 1.5 mL Eppendorf tube 中，再加入等量的 2-propanol 且混合，靜置 10 分鐘後並以 12000 rpm、15 分鐘、4 °C 離心使 RNA 沈澱，最後將沉澱的 RNA 以酒精洗淨後乾燥，並溶於 50 μL UltraPure DNase/RNase-Free distilled water 中，並以 -20 °C 保存 (如圖 3-4 所示)。RNA 樣品會利用 Take3 Trio Micro-Volume plates 在微量盤式分光光度計檢測其在 260 nm 和 280 nm 下的吸光值，當 OD260=1 時，RNA 濃度約為 40 μg/mL。我們利用這樣的方式來計算出 RNA 含量，而 RNA 的純度會由 OD260/OD280 的比值來觀察，比值為 1.6-1.8 範圍的



情況下才接著進行之後的 cDNA 合成。

我們接著利用 PrimeScript 1st strand cDNA synthesis kit 進行 cDNA 合成，將 1 μ L Random 6 mer 與 1 μ L dNTP Mixture 及 500 ng 的細胞 RNA，加入至 PCR tube 中，再加入 RNase free water 至 10 μ L 並進行 Pipetting 混合，再於 65 $^{\circ}$ C 下加熱 5 分鐘後，置於冰上冷卻後即為 RNA/Primer Mixture。將上述 10 μ L RNA/Primer mixture 的溶液，分別加入 4 μ L 5x PrimeScript Buffer、0.5 μ L RNase inhibitor、1 μ L PrimeScript RNase，最後加入適量的 RNase free water 使最終 PCR tube 內的體積為 20 μ L。之後再以 Pipetting 混合後，分別以 30 $^{\circ}$ C、10 分鐘；42 $^{\circ}$ C、45 分鐘；95 $^{\circ}$ C、5 分鐘之三種處理方式使反轉錄酶失活後置於 4 $^{\circ}$ C 冷卻，最後即可得到 1st strand cDNA 的合成反應液，此 cDNA 溶液可置於 -20 $^{\circ}$ C 下保存。

我們最後利用 Rotor-Gene SYBR Green PCR kit 將上述的 cDNA 進行增幅，並進行分析使用。步驟為混合 10 μ L Master mix 2x、8 μ L H₂O RNase free water、以及欲檢測基因表現 (Albumin、CYP1A1、CYP1A2、CYP3A4、Follistatin、Tryptophan 2,3-dioxygenase、Actin) 的引子序列 (包含 0.5 μ L FW primer、以及 0.5 μ L RW primer) (如表 3-1 所示)、以及上述合成的 cDNA 1 μ L 等，最終將總量為 20 μ L 的溶液全部加入於 PCR tube 中並均勻混和，最後再利用 Rotor-GeneQ 進行 3-step reaction，其中 Housekeeping gene 為 Actin。最後結果會以 t-test 做統計學分析，Day 7、Day 15 的結果與 Day 3 的結果作比較來分析。

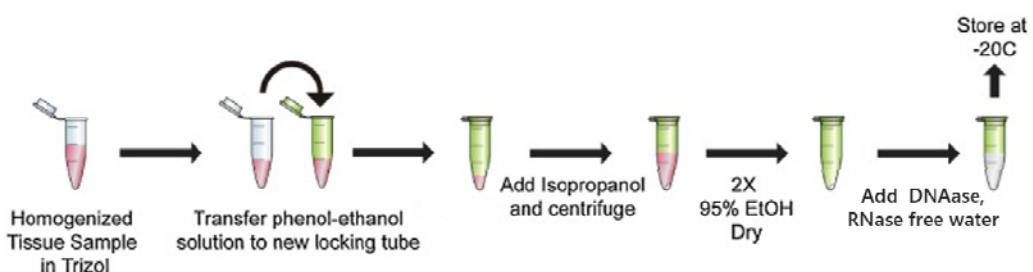


圖 3-4 RNA 萃取步驟示意圖 (Kopec *et al.*, 2017) 。

表 3-1 Quantitative real-time PCR 所使用之引子序列。

Gene	Primers (5'-3')	Size (bp)
Albumin	F:CTTCAAAGCCTGGGCAGTAG R:AGTAATCGGGGTGCCTTCTT	395
Follistatin	F:CGCTGCCAGGTCCCTGTAT R:GGCAGGCACTGGAGTAAGTC	535
tryptophan	F:GAAGACGGAGCTAAACTGG	533
2,3-dioxygenase	R:AATAGCGTCTGCTCCTGCTC	
CYP 1A2	F:ATGGGCAAGCGCCGGTTGTAT R:CAGTTGATGGAGAACAGCGCAGCC	194
CYP3A4	F: AAGTCGCCTCGAAGATACACA R: AAGGAGAGAACACTGCTCGTG	169
Actin	F:GGCACACACTTCTACAATGA R:TCTCTTAATGTCACGCACGAT	387

F: forward; R: reverse;



3.7.4 尿素 (Urea) 分泌量檢測

實驗採用 QuanticChromTM Urea Assay Kit (DIUR-100) 來檢測肝細胞在培養液中的尿素分泌量，將 Urea standard (50 mg/dL) 以水稀釋成 5mg/dL，總體積為 50 μ L 作為標準品，而以 50 μ L 之二次水作為檢測之 Blank，將待測上清液樣品 50 μ L 依序加入至 96 孔盤中。之後將 Reagent A 和 Reagent B 以 1:1 混合而成 Working reagent，在 96 孔盤的每孔中加入 200 mL 的 Working reagent 並輕拍 (Padding) 使待測樣品和 Working reagent 混合，並於室溫下反應 50 分鐘，最後以微量盤式分光光度計檢測 430 nm 下的吸光值，尿素濃度使用 $[Urea] = \frac{OD_{sample}-OD_{blank}}{OD_{standard}-OD_{blank}} \times n \times [STD]$ (mg/dL)，公式計算出具體尿素含量，此時的 $n=1$ ， $[STD]$ 為標準品濃度 5 mg/dL (Sekiya and Suzuki, 2011)。

3.7.5 次世代定序 (Next generation sequencing, NGS)

小型肝細胞於 Dish 上培養 7、14 天後分別用 TRIzol[®] 萃取出小型肝細胞的 RNA。並將 RNA 樣品送至 Genomics (基龍米克斯)，並接著以 NanoDrop 來檢測樣品的濃度、吸光值 OD 260/280 與 OD260/230。而濃度與品質測定則使用 Agilent 2100 Bioanalyzer -- RNA 6000 Nano kit；確認樣品總量與品質皆達允收標準 (Level A，RIN 值 > 7 、28S : 18S ≥ 1.0 、260/280 : 1.8 ~ 2.2、260 / 230 ≥ 2.0) 後，則會進一步對樣品進行全基因組重測序 (Whole Genome Sequencing)。待定序完後，利用 FastQC 檢測所定序序列之品質，接著利用 Bowtie 2 將所定序之序回貼至所使用的基因庫中；最後再利用 RNA-Seq by expectation-maximization (RSEM) 對其進行定量 (如圖 3-5 所示)。

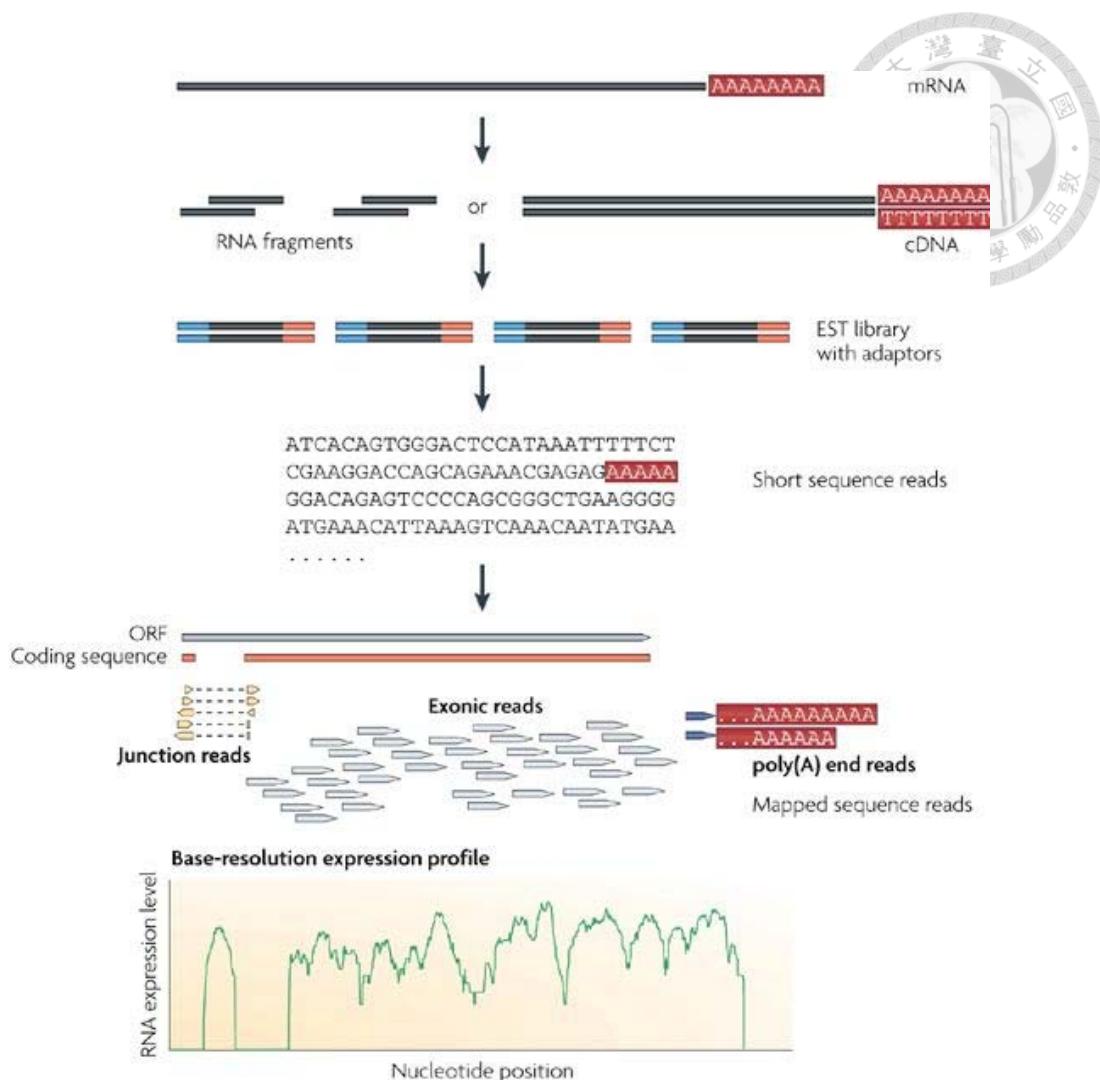


圖 3-5 NGS 流程示意圖。 (Wang, Gerstein, and Snyder, 2009)



第四章 結果與討論

4.1 細胞懸浮液組成分析結果

由小型肝細胞的細胞懸浮液經 Cytocentrifuge 後於螢光顯微鏡下所觀察的結果可知，具 CK18 表現之細胞佔總細胞數之少數（圖 4-1 A, B），我們可推論由活體取出的肝細胞在經過小型肝細胞分離步驟（會將大部分的肝實質細胞捨棄，只留下肝非實質細胞）後，所得之細胞懸浮液中成熟肝細胞佔相對少數。但反之 CK19 之表現量在小型肝細胞的細胞懸浮液中有較多之表現（圖 4-1 C, D）（由顯微鏡觀察可知，紅色的細胞數明顯大於綠色的細胞數），我們亦可推論具前驅細胞表現之細胞佔此懸浮液之相對多數；因此我們可得知藉由我們所改良後的小型肝細胞分離步驟下，所取得之細胞大多為具有前驅細胞表現之細胞。

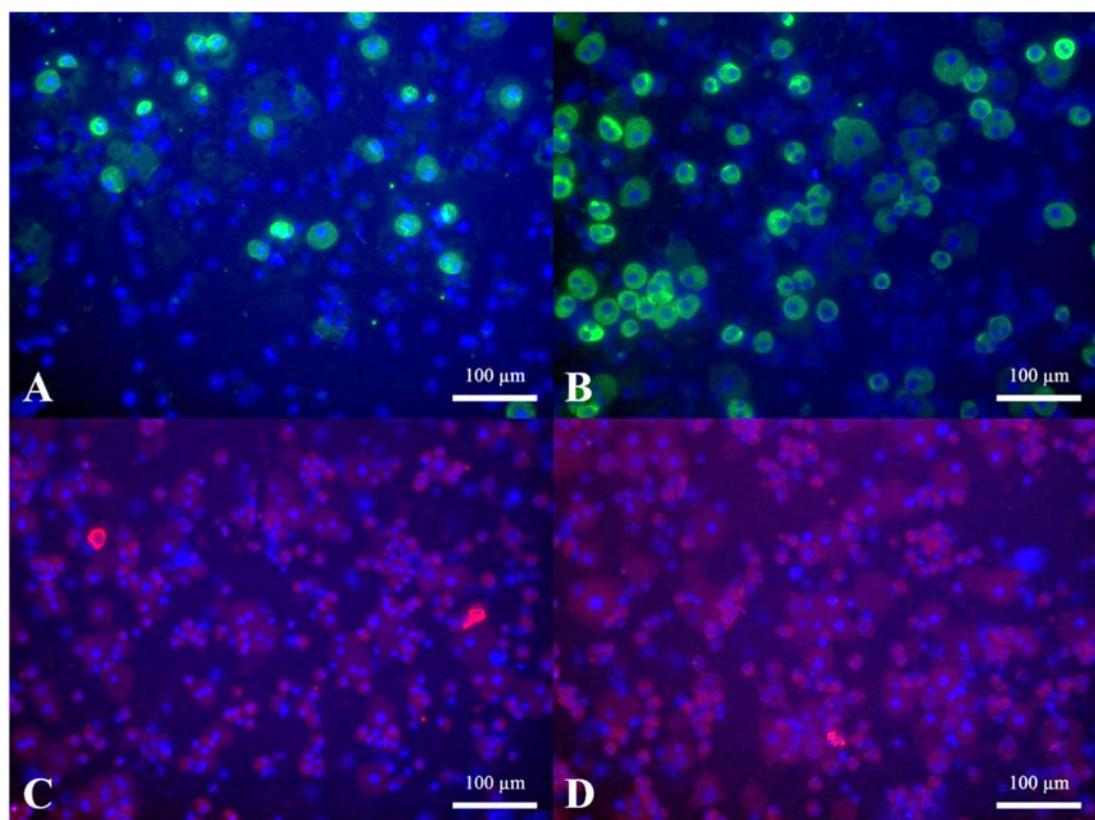


圖 4-1 小型肝細胞分離步驟之細胞懸浮液經 Cytocentrifuge 後在螢光顯微鏡下所觀察的結果；(A)、(B) 為 CK18 下之染色結果；(C)、(D) 為 CK19 下之染色結果。藍色：DAPI 為細胞核之染劑，綠色：CK18 為成熟肝細胞之 Marker，紅色：CK19 為肝前驅細胞之 Marker。（Scale bar = 100 μm ）



4.2 肝細胞培養結果

4.2.1 利用不同分離步驟來採取小型肝細胞之比較

經過多天培養後，在未調整步驟前 (Chen, Q 及其團隊之採取方式) (150 g、5 分鐘、4 °C，取上清液)，以相同細胞密度在 Dish 上培養 1 天後，貼附的細胞數較少 (圖 4-2 A)；相較我們將步驟調整後 (150 g、5 分鐘、4 °C，取 cell pellet) 培養一天的結果後，有貼附並有生長之細胞數較多 (圖 4-2 D)。此外，在未調整步驟下培養的細胞在經過 3 天的培養下，其生長型態與前人提及之形成聚落之結構有明顯的不同 (圖 4-2 B) (Ishii et al., 2017)，且在培養 5 天後，生長型態大多呈現類似纖維細胞之型態 (圖 4-2 C)；另外一方面，我們將步驟進行調整後所取得之細胞在培養 3 天時有較多貼附之型態 (圖 4-2 E)，而在培養 6 天後細胞會形成聚落之結構 (圖 4-2 F)，與前人提及小型肝細胞之型態相近 (Ishii et al., 2017)，因此我們推測在調整採取步驟後所得之細胞可能為小型肝細胞。而這個結果亦與細胞懸浮液組成分析的結果 (圖 4-1) 相符合。

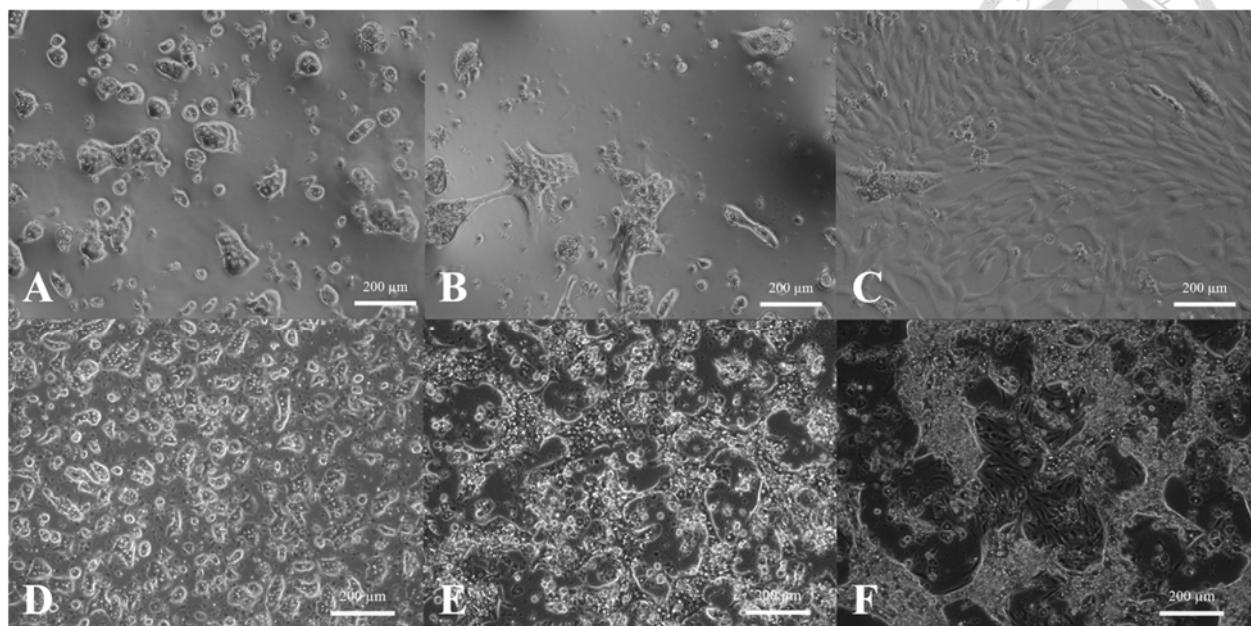


圖 4-2 利用不同分離步驟來採取小型肝細胞並培養於 Dish 上之比較；(A) 為 Chen, Q 及其團隊之採取方式 (150 g 、 5 分鐘、 4°C ，取上清液) 下培養 1 天之結果，(B) 為 Chen, Q 及其團隊之採取方式下培養 3 天之結果，(C) 為 Chen, Q 及其團隊之採取方式下培養 5 天之結果；(D) 為本研究將 Chen, Q 的方法進行調整後之採取方式 (150 g 、 5 分鐘、 4°C ，取 cell pellet) 下培養 1 天之結果，(E) 為調整後之採取方式下培養 3 天之結果，(F) 為調整後之採取方式下培養 6 天之結果，以上皆使用相位差顯微鏡所觀察的結果 (Scale bar = $200\text{ }\mu\text{m}$)。



4.2.2 小型肝細胞與成熟肝細胞於體外培養之型態比較

由肝細胞在 Dish 培養下使用相位差顯微鏡所觀察的結果可知，初代肝細胞於培養 3 天後（圖 4-3 B），細胞型態較為貼附並延伸，邊緣輪廓清晰且有約半數的細胞呈現多核的情況，為較具功能之肝細胞型態 (Hou *et al.*, 2010)。但由於初代肝細胞是藉肝臟切除取得，因此肝細胞在體外培養會因為 EMT 的機制而使肝細胞逐漸失去其特徵，最後會發現肝細胞由原本具功能的間葉型態 (Mesenchymal)（圖 4-3 A, B）轉為支持性的表皮型態 (Epithelial)（圖 4-3 C, D) (Choi and Diehl, 2009; Zeisberg *et al.*, 2007)。

另外一方面，小型肝細胞在培養 3 天後（圖 4-3 E, F），細胞型態上也較為貼附且呈多核之型態，但在培養 5 天後（圖 4-3 G），細胞除了仍然維持具有功能的間葉型態之外，細胞亦有群聚 (Colony) 的趨勢。而這樣的細胞聚落在相位差顯微鏡觀察下除了發現具有平面的群聚外（圖 4-3 H），隨著培養時間的增加，細胞仍會繼續往上堆疊最後於 Colony 上形成肝細胞的三次元球 (Spheroid)，且能維持相同型態至少 3 週（圖 4-4）。而這樣的三次元球的形成亦是一般認為肝細胞能夠維持其機能的重要證據之一。

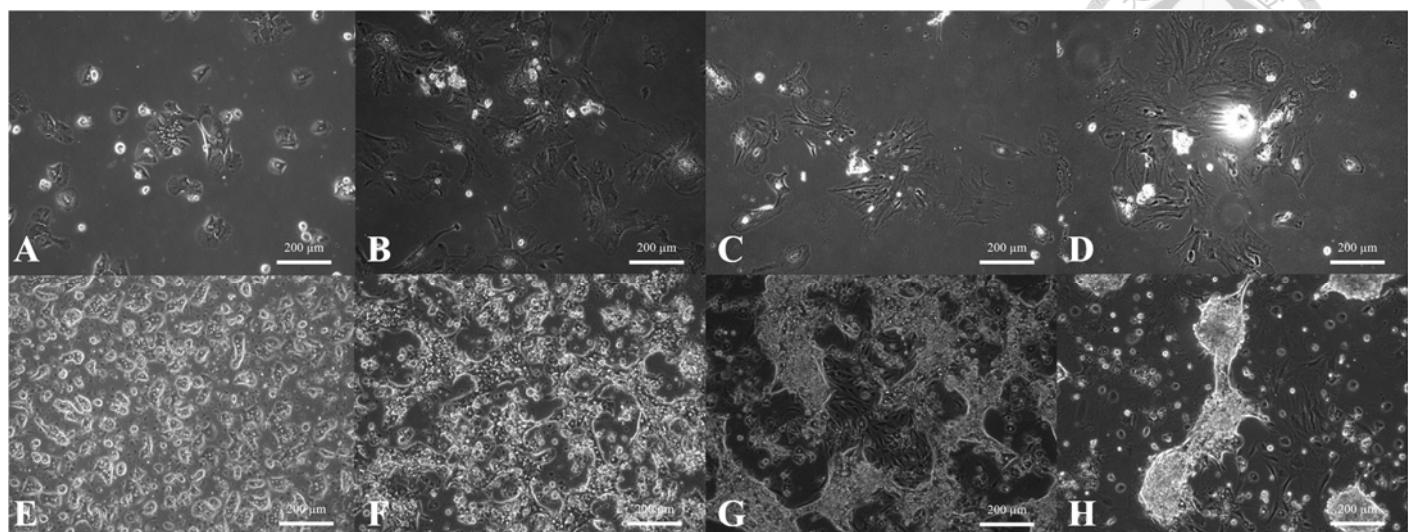


圖 4-3 肝細胞在 Dish 培養下使用相位差顯微鏡所觀察的結果；(A) 為培養 1 天的成熟肝細胞，(B) 為培養 3 天的成熟肝細胞，(C) 為培養 5 天的成熟肝細胞，(D) 為培養 7 天的成熟肝細胞；(E) 為培養 1 天的小型肝細胞，(F) 為培養 3 天的小型肝細胞，(G) 為培養 6 天的小型肝細胞，(H) 為培養 9 天的小型肝細胞。 (Scale bar = 200 μm)。

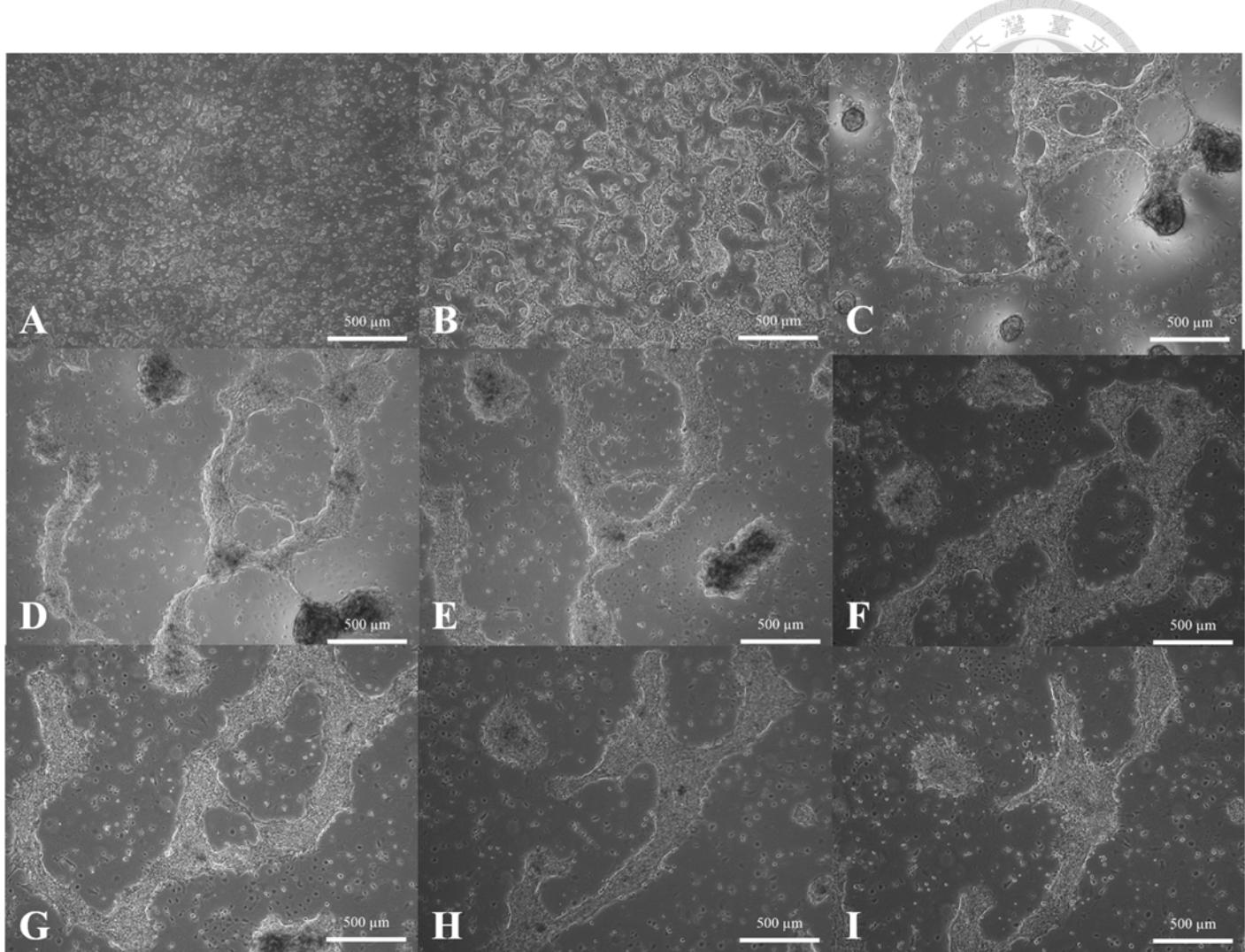


圖 4-4 小型肝細胞在 Dish 長時間培養下，在相近位置（如圖 3-2 所示）使用相位差顯微鏡所觀察的結果；(A) 為培養 1 天的小型肝細胞，(B) 為培養 3 天的小型肝細胞，(C) 為培養 6 天的小型肝細胞，(D) 為培養 9 天的小型肝細胞，(E) 為培養 12 天的小型肝細胞，(F) 為培養 15 天的小型肝細胞，(G) 為培養 18 天的小型肝細胞，(H) 為培養 21 天的小型肝細胞，(I) 為培養 24 天的小型肝細胞。(Scale bar = 500 μ m)



4.3 活體螢光染色

為了確認小型肝細胞所形成的細胞聚落中細胞是否能維持一定的生存率，因此我們在小型肝細胞於 Dish 培養下第 12 與第 35 天分別進行的 ReadyProbes® Cell Viability Imaging Kit 螢光染色。細胞聚落在大小約 300 μm-400 μm 下，細胞仍能大多維持生存（圖 4-5），只有往上堆疊部份可能因養份擴散問題，造成部份細胞死亡。這樣的結果與 Spheroid 形成（一般大小約為 100-200 μm）之後，內部的細胞會因為養分供應不足造成缺氧現象而壞死的情況大不相同（Glicklis, Merchuk, and Cohen, 2004）。綜合上述結果（圖 4-4，圖 4-5）可以得知，小型肝細胞在體外培養會形成大小約為 300 μm-400 μm 左右的聚落，而這些聚落亦會繼續與其他聚落/細胞進行堆疊最後在聚落的中間部位形成三次元球而繼續生長。

為了進一步了解小型肝細胞在形成三次元球之同時，細胞是否會分化為成熟肝細胞，我們分別利用 CK18 抗體及 DAPI 進行染色（圖 4-6）。由結果可知隨著細胞生長，綠色螢光（CK18）之表現有越來越多的趨勢，而由此可推測小型肝細胞有分化為成熟肝細胞之現象。

因此這樣的三次元球細胞型態不但具備能維持體外培養的長時間生存能力，且亦會隨著培養時間增加逐漸有肝臟機能的特性，這些結果也應證了小型肝細胞能做為肝臟體外生物平台的優勢之一。

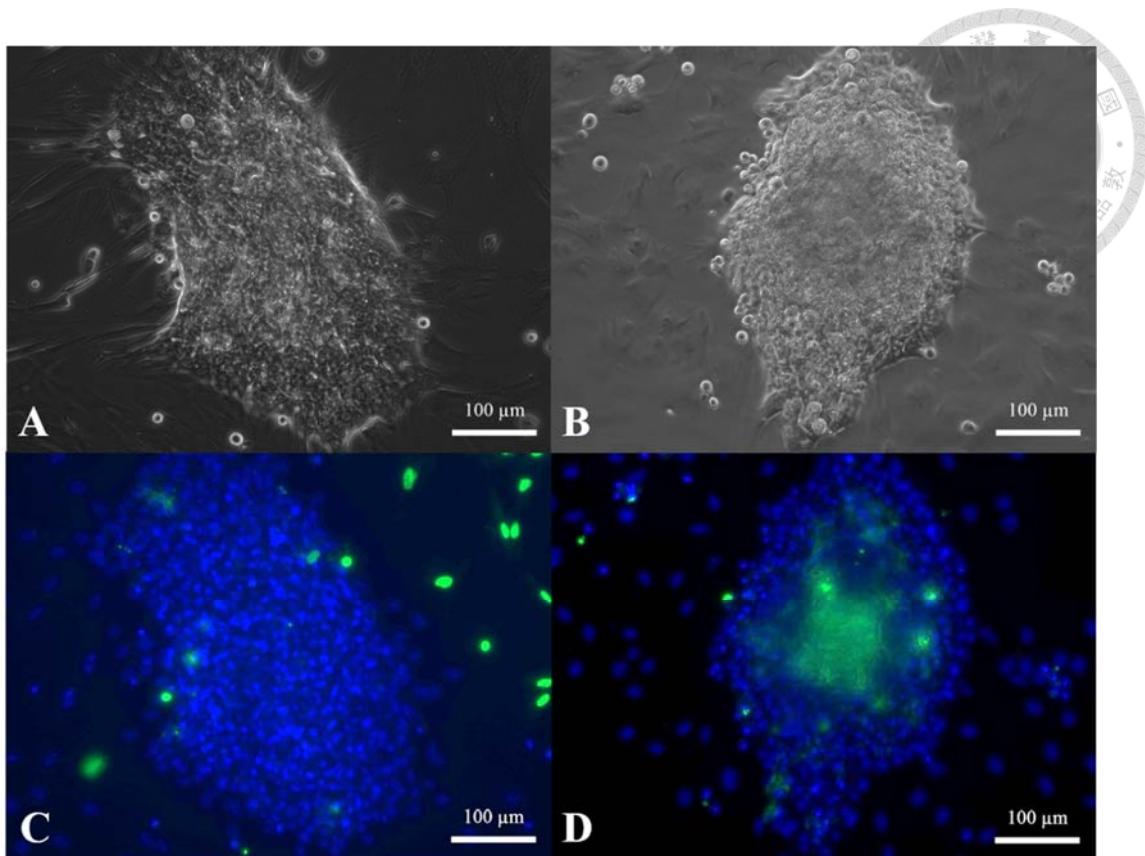


圖 4-5 為小型肝細胞在 Dish 下培養 12 及 35 天，分別以相位差顯微鏡以及螢光顯微鏡所觀察之結果；(A) 為培養 12 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果，(B) 為培養 35 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果，(C) 為培養 12 天的小型肝細胞在螢光顯微鏡下之觀察結果，(D) 為培養 35 天的小型肝細胞在螢光顯微鏡下之觀察結果。藍色：DAPI，綠色：NucGreen® Dead reagent。(Scale bar = 100 μ m)。

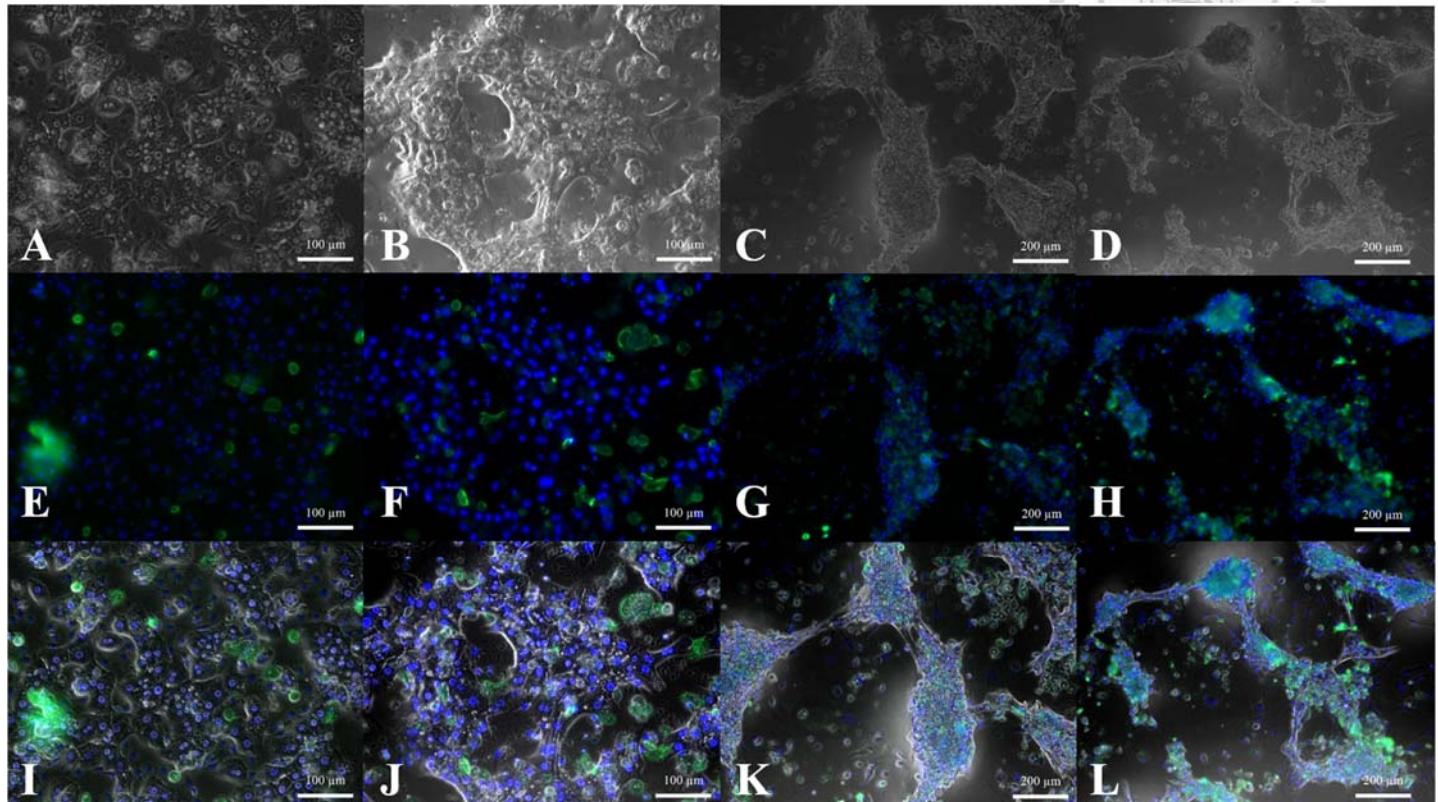


圖 4-6 為小型肝細胞在 Dish 下培養 1、3、8、15 天後分別於相位差顯微鏡及螢光顯微鏡所觀察的結果；(A) 為培養 1 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果，(B) 為培養 3 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果，(C) 為培養 8 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果，(D) 為培養 15 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果；(E) 為培養 1 天的小型肝細胞在螢光顯微鏡下之觀察結果，(F) 為培養 3 天的小型肝細胞在螢光顯微鏡下之觀察結果，(G) 為培養 8 天的小型肝細胞在螢光顯微鏡下之觀察結果，(H) 為培養 15 天的小型肝細胞在螢光顯微鏡下之觀察結果；(I) 為培養 1 天的小型肝細胞於兩種顯微鏡觀察結果之組合，(J) 為培養 3 天的小型肝細胞於兩種顯微鏡觀察結果之組合，(K) 為培養 8 天的小型肝細胞於兩種顯微鏡觀察結果之組合，(L) 為培養 15 天的小型肝細胞於兩種顯微鏡觀察結果之組合。藍色：DAPI，綠色：CK18。(Scale bar = 100 μm)



4.4 Quantitative real-time PCR

除了上述的細胞型態學可以推測小型肝細胞在體外培養下（圖 4-3、圖 4-4、圖 4-5 及圖 4-6），其機能可以長時間維持之外，真實肝機能定量的結果更必須經過生化分析驗證來得到證實。因此我們接著將小型肝細胞於 Dish 上分別培養 3、7、15 天後萃取 RNA，將其反轉錄為 cDNA 後，分別對 Actin、Albumin、Follistatin、Tryptophan 2,3-dioxygenase 及 CYP1A2 的序列進行 qPCR 測定。由圖形可知 Albumin (圖 4-7 A)、CYP1A2 (圖 4-7 C) 及 Tryptophan 2,3-dioxygenase (圖 4-7 D) 的表現量會隨培養時間增加；而 Follistatin (圖 4-7 B) 表現量會隨培養時間增加而下降。由 qPCR 的結果可加強我們的推測：(1) 小型肝細胞在體外培養下，有分化為成熟肝細胞的趨勢，因此小型肝細胞的特徵 Marker (FO) 會逐漸消失，而成熟肝細胞的特徵 Marker (TO) 會越來越明顯；(2) 而由 Albumin、CYP1A2 的相對表現量亦可得知肝機能也會隨著培養時間增加而增加。

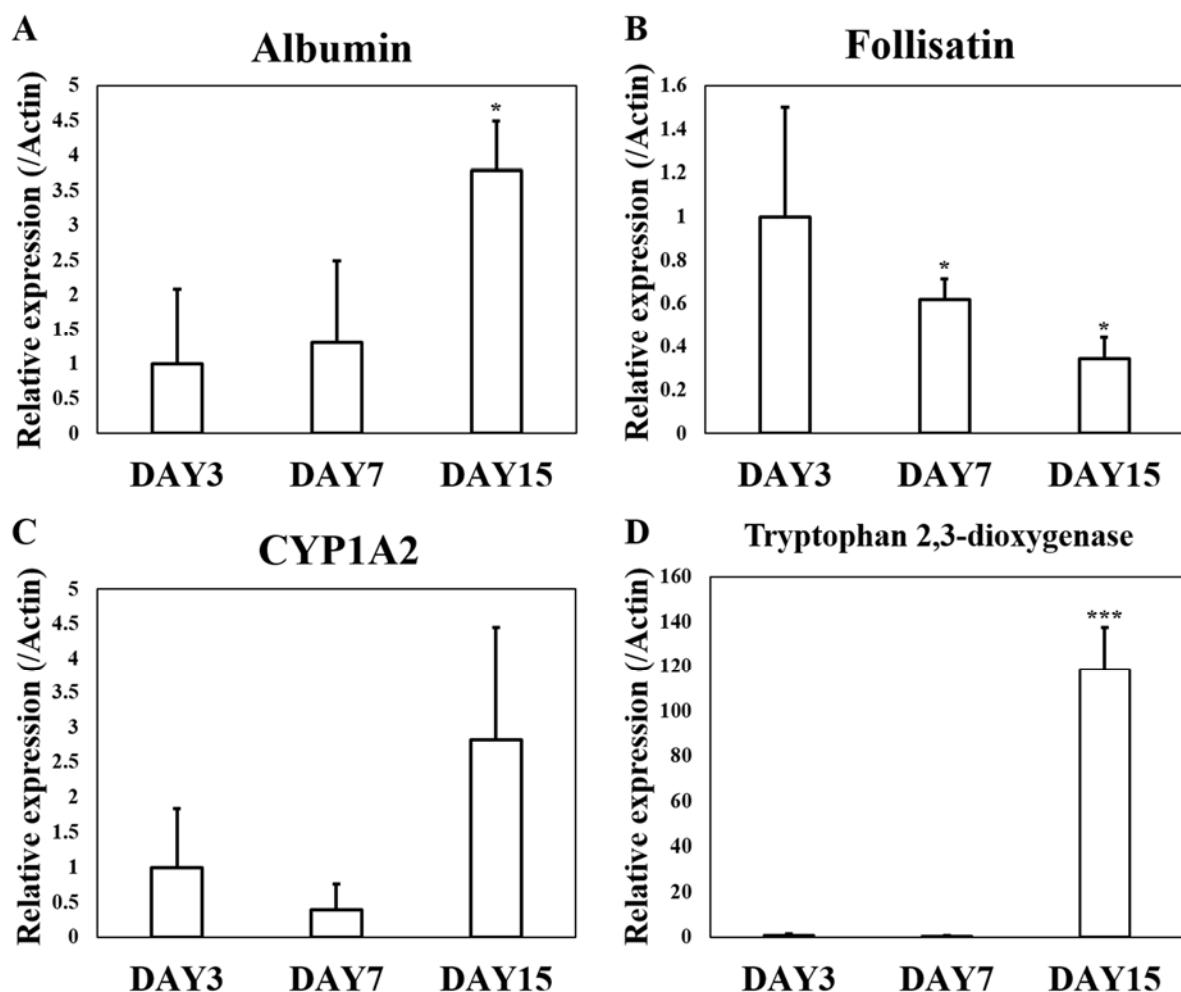


圖 4-7 小型肝細胞於培養於 Dish 上 3、7、15 天後的 Quantitative real-time PCR 結果；(A) 為小型肝細胞隨著培養時間增加後 Albumin (肝機能) 的 RNA 表現之結果，(B) 為小型肝細胞隨著培養時間增加後 Follistatin (小型肝細胞之 Marker) 的 RNA 表現之結果，(C) 為小型肝細胞隨著培養時間增加後 CYP1A2 (肝機能) 的 RNA 表現之結果，(D) 為小型肝細胞隨著培養時間增加後 Tryptophan 2,3-dioxygenase (小型肝細胞的 Marker) 的 RNA 表現之結果。(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ significant difference vs. Day3)



4.5 次世代定序 (NGS)

我們亦對小型肝細胞於 Dish 上分別培養 7、14 天後萃取 RNA，利用 NGS 之方式對其 RNA 序列進行測定並定序，並分別對 CK 18、CK 19、CD 44 及 GAPDH 的表現量進行比較（圖 4-8）。由圖形可知 CK 18 及 CK 19 之表現隨培養時間增加而上升，而 CD 44 之表現隨培養時間增加而下降；由 NGS 的結果可加強我們的推測：(1) 小型肝細胞在體外培養下，有分化為成熟肝細胞的趨勢，因此小型肝細胞的特徵 Marker (CD 44) 會逐漸消失。(2) 而成熟肝細胞的特徵 Marker (CK 18) 會越來越明顯，且膽管功能的 Marker (CK19) 也增加，表示小型肝細胞亦可能分化成具膽管功能之細胞。這樣的結果也與圖 4-7 的結果一致。

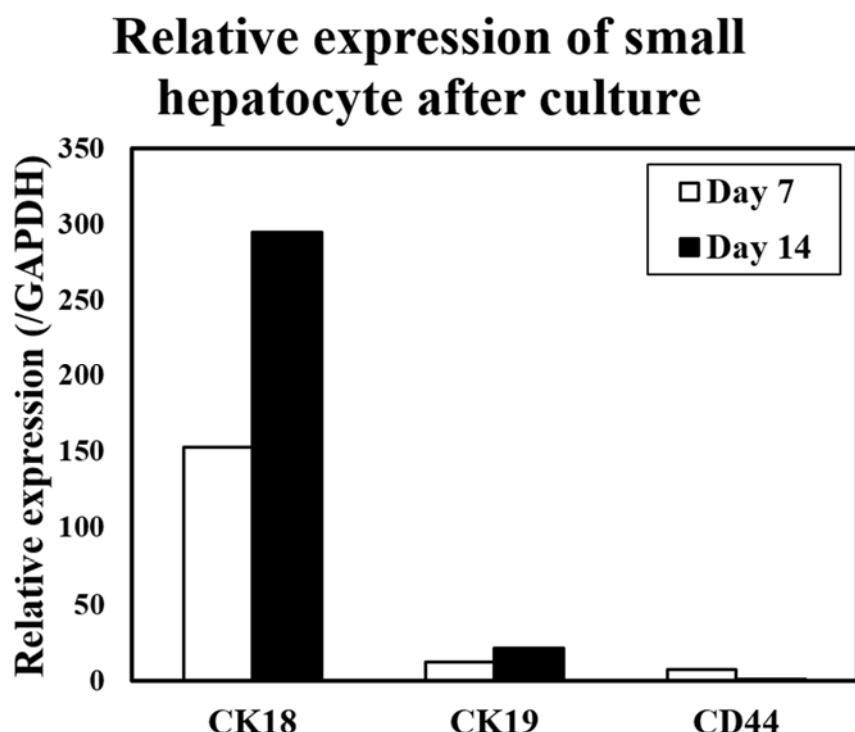


圖 4-8 小型肝細胞於培養於 Dish 上 7、14 天後的次世代定序的結果。



4.6 肝細胞之白蛋白分泌量

由白蛋白的分泌量結果得知小型肝細胞在培養至 14 天後（圖 4-9），其肝蛋白表現量會隨著培養時間增加而上升。另外一方面，由於 qPCR 之結果需由真實細胞蛋白之分泌量以驗證，而我們由 qPCR 中 Albmuin 之結果（圖 4-7 A）亦可得知小型肝細胞之白蛋白的基因表現量從 3 天至 15 天呈一上升之趨勢，因此可以證實 qPCR 的結果與白蛋白的分泌量結果具有一致性。另外一方面，小型肝細胞的分泌量較相同條件培養下之成熟肝細胞有更高之白蛋白之分泌量，且能維持更長的分泌之機能，這樣的結果亦可以由兩者之體外培養之型態的結果（圖 4-3）來證實。因此綜合上述結果我們可得知：小型肝細胞在體外培養下，有分化為成熟肝細胞的趨勢而具有成熟肝細胞之分泌功能，且維持 15 天；而成熟肝細胞在體外培養下，白蛋白分泌量會隨著培養時間的增加而逐漸下降，這樣的結果也與過往研究相同 (Hou *et al.*, 2010)。



Albumin secretion

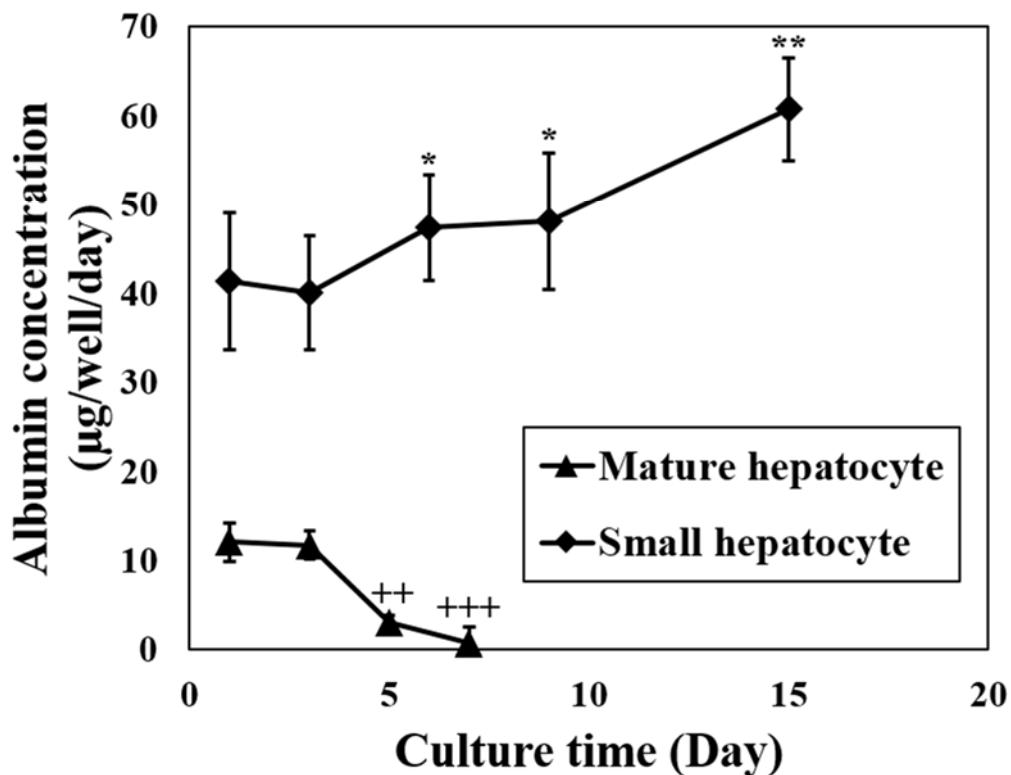


圖 4-9 成熟肝細胞與小型肝細胞於 Dish 上隨著培養時間的白蛋白分泌量之變化情況。(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ significant difference vs. small hepatocyte at Day1 ; ++ : $p < 0.01$, +++ : $p < 0.001$ significant difference vs Mature hepatocyte at Day1)



4.7 肝細胞之尿素分泌量

肝機能之指標除了白蛋白之分泌外，尿素代謝亦是另一肝機能之指標。由尿素分泌量結果得知（圖 4-9），成熟肝細胞之代謝機能相較小型肝細胞低，且能維持之時間也相較短。但小型肝細胞之代謝機能在培養期間呈一下降之趨勢，我們推測小型肝細胞可能在分化後無明顯之代謝功能。但這樣的結果仍需進一步驗證。

Hepatocytes urea assay

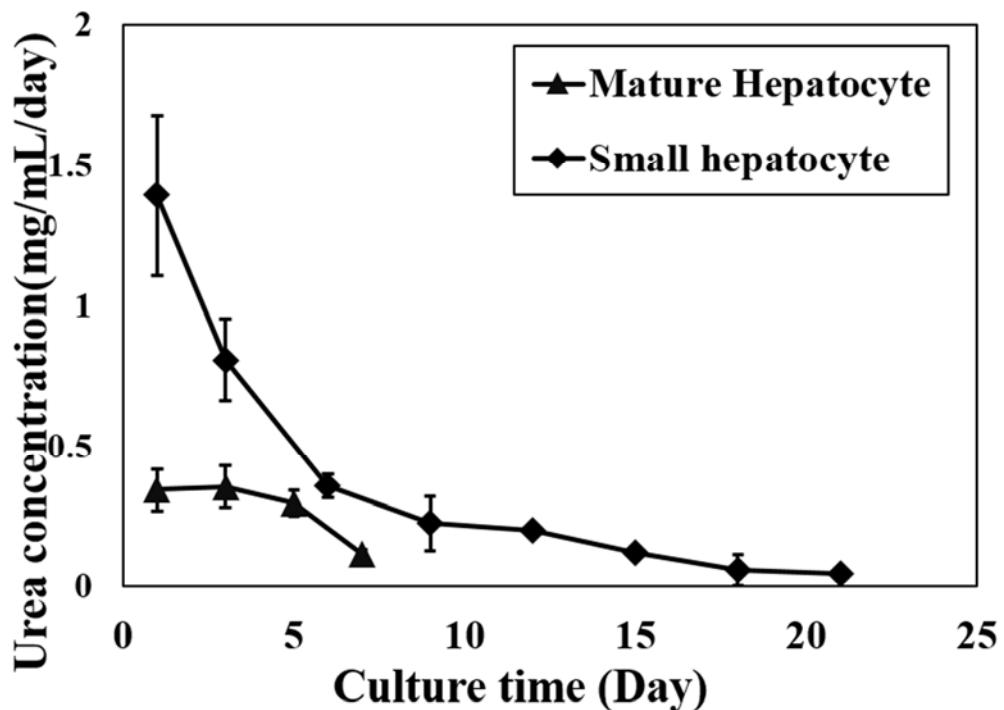


圖 4-10 成熟肝細胞與小型肝細胞於 Dish 上隨著培養時間的增加，其尿素分泌量之變化情況。



4.8 PMMA 微流道製作結果

4.8.1 肝細胞於經光固化膠處理的 PMMA 上進行培養之結果

為確認樹脂黏合（光固化膠）及微波黏合（無處理的 PMMA）是否對細胞生長有影響，我們分別將塗有光固化膠的 PMMA 及未處理的 PMMA 上培養細胞。由相位差顯微鏡觀察的結果，可發現成熟肝細胞於有光固化膠的 PMMA 培養一天後並沒有明顯之貼附形態，而大多呈現球形（圖 4-11 A）；無作處理之 PMMA 上培養之細胞，貼附情況較佳，而細胞有呈多核的形態（圖 4-11 B），與前人指出成熟肝細胞之生長形態相較符合 (Hou *et al.*, 2010)。我們推測光固化膠可能對肝細胞生長有部分影響，因此我們選擇以微波加熱方式黏合 PMMA。

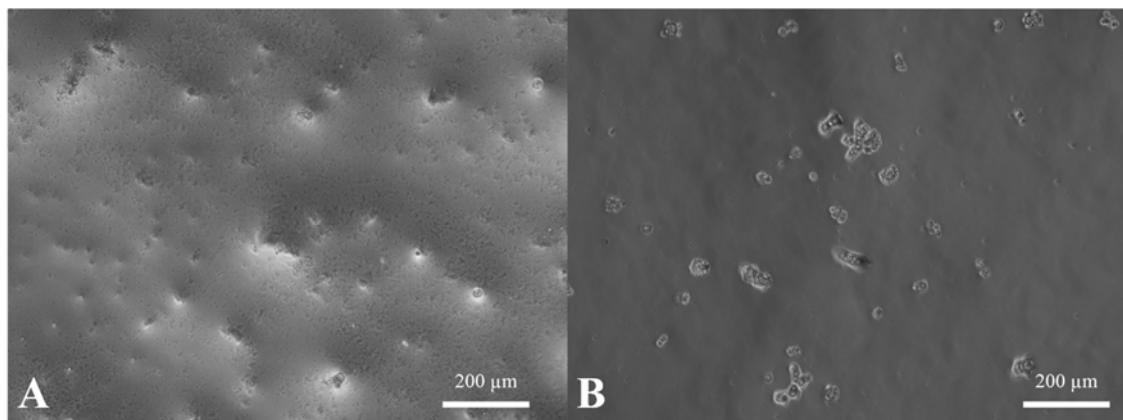


圖 4-11 為成熟肝細胞在不同 PMMA 黏合材料下培養 1 天，以相位差顯微鏡所觀察之結果；(A) 塗有光固化膠的 PMMA 上培養 1 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果，(B) 無處理的 PMMA 上培養 1 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果。 (Scale bar = 200 μm)



4.8.2 PMMA 微流道表面處理結果比較

由相位差顯微鏡觀察結果可知，由於雷射雕刻造成的熔融，使表面有可見的突起物，因此未經前處理之 PMMA 微流道於相位差顯微鏡下，不易觀察細胞生長形態（圖 4-12 A）；相較之下，有經 Acetone/Ethanol 前處理的 PMMA 流道在相位差顯微鏡下較易觀察微流道內的環境（圖 4-12 B），因此我們採用經 Acetone/Ethanol 前處理的 PMMA 微流道作為後續細胞培養的平台。上述的結果均只有 PMMA 微流道的型態觀察而無任何細胞種植於上。

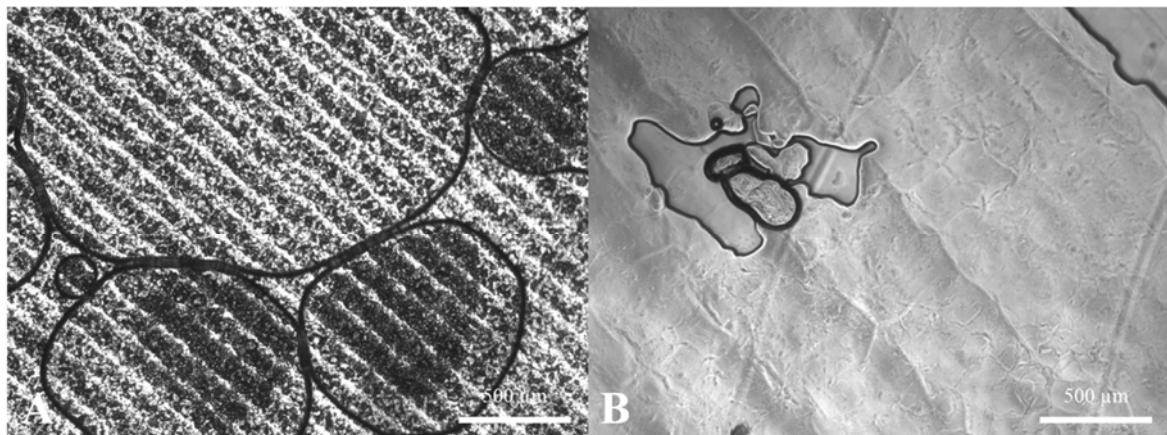


圖 4-12 為 PMMA 微流道表面處理前後，以相位差顯微鏡所觀察之結果；(A) 未經 Acetone/Ethanol 前處理的 PMMA 微流道在相位差顯微鏡下之觀察結果。(B) 經 Acetone/Ethanol 前處理的 PMMA 微流道在相位差顯微鏡下之觀察結果。(Scale bar = 500 μm)。上述的結果均只有 PMMA 微流道的型態觀察而無任何細胞種植於上。



4.9 小型肝細胞於 PMMA 微流道培養結果

4.9.1 於不同濃度膠原蛋白修飾的微流道之培養結果比較

利用成熟肝細胞找出較適合之 PMMA 微流道製程條件後（圖 4-11），我們接著嘗試在 PMMA 微流道上培養小型肝細胞。而為了找出於較適合小型肝細胞生長的條件，我們比較一般用於修飾在 2D dish 培養 (0.1 mg/mL) 、及實驗室前人用於 PDMS 微流道中 (0.3 mg/mL) 的不同膠原蛋白濃度來進行探討。由顯微鏡下之觀察結果得知在 0.1 mg/mL 的膠原蛋白修飾之 PMMA 微流道上培養 1 天後的細胞大多成一聚集而非貼附之型態（圖 4-13 A），而經 ReadyProbes® Cell Viability Imaging Kit 染色觀察後，綠色螢光之表現較多，表示其聚集的細胞大多為死細胞（圖 4-13 C）；而以 0.3 mg/mL 膠原蛋白修飾之 PMMA 微流道上，細胞較多呈貼附生長的形態（圖 4-13 B），且在染色結果也發現細胞生存率較 0.1 mg/mL 濃度下修飾 PMMA 微流道上培養結果高（圖 4-13 D）。這些結果表示經 0.3 mg/mL 膠原蛋白修飾的 PMMA 微流道較適合小型肝細胞生長。

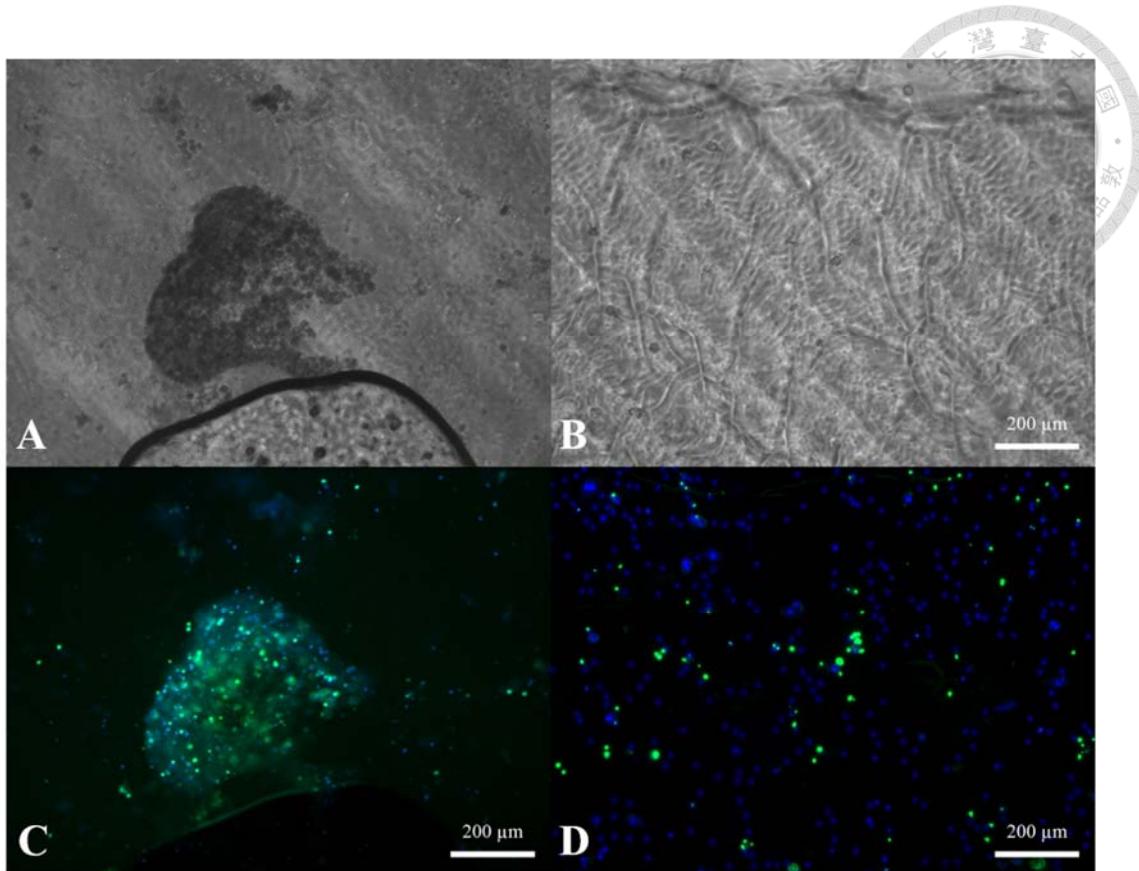


圖 4-13 為小型肝細胞在修飾不同濃度的膠原蛋白濃度 PMMA 流道下培養 1 天，分別以相位差顯微鏡以及螢光顯微鏡所觀察之結果；(A) 為修飾 0.1 mg/mL 的膠原蛋白的 PMMA 微流道上培養 1 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果，(B) 為修飾 0.3 mg/mL 的膠原蛋白的 PMMA 微流道上培養 1 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果，(C) 為修飾 0.1 mg/mL 的膠原蛋白的 PMMA 微流道上培養 1 天的小型肝細胞在螢光顯微鏡下之觀察結果，(D) 為修飾 0.3 mg/mL 的膠原蛋白的 PMMA 微流道上培養 1 天的小型肝細胞在螢光顯微鏡下之觀察結果。藍色：DAPI，綠色：NucGreen® Dead reagent。(Scale bar = 200 μ m)。



4.9.2 以膠原蛋白修飾的培養皿與微流道之培養結果比較

最後我們比較小型肝細胞在 Dish 及 PMMA 流道上培養一天後的細胞生長情況。Dish 上的小型肝細胞雖有貼附（圖 4-14 A），但在染色後發現細胞死亡率為 49.5 %（圖 4-14 C），而 PMMA 流道上之細胞經一天培養後生存率為 76.4 %（圖 4-14 D），相較 Dish 之結果高了約 27 %，表示在 PMMA 流道上培養的小型細胞有較好的生長情況，但細胞機能仍需進一步的確認。

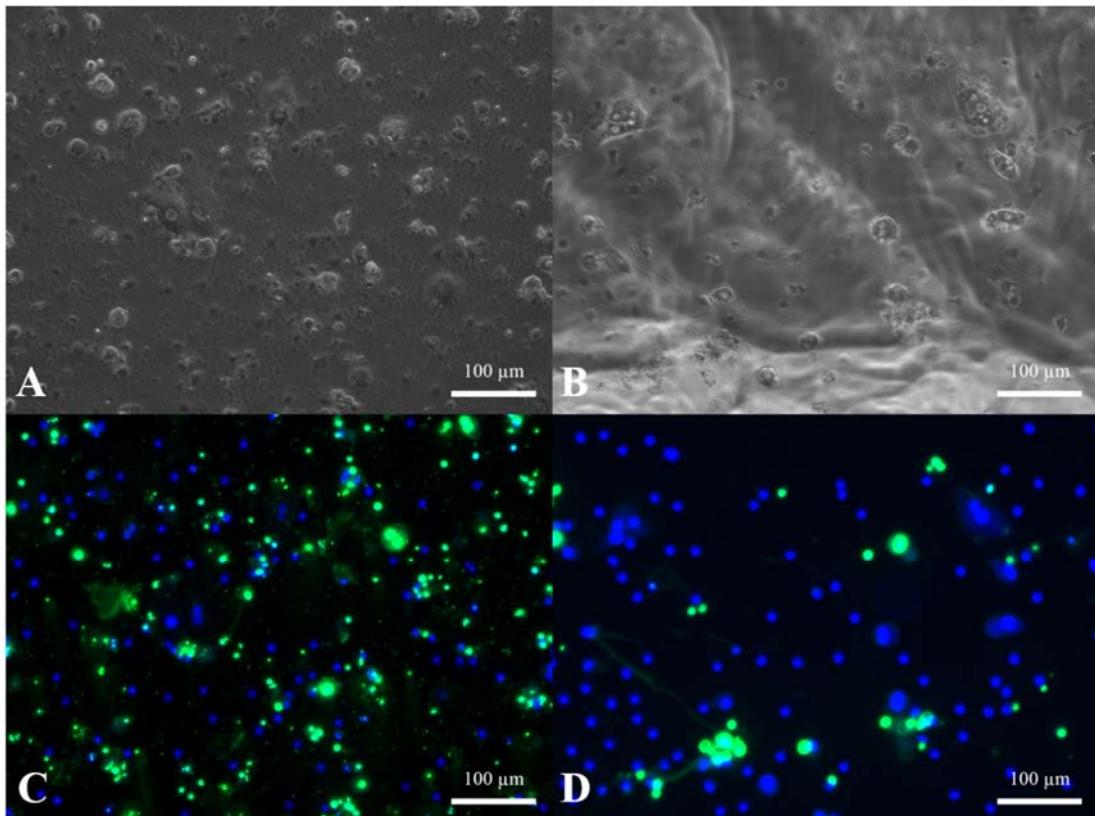


圖 4-14 為小型肝細胞在 Dish 及 PMMA 流道下培養 1 天，分別以相位差顯微鏡以及螢光顯微鏡所觀察之結果，(A) 為 Dish 上培養 1 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果，(B) 為 PMMA 流道上培養 1 天的小型肝細胞在相位差顯微鏡下之觀察結果，(C) 為 Dish 上培養 1 天的小型肝細胞在螢光顯微鏡下之觀察結果，(D) 為 PMMA 流道上培養 1 天的小型肝細胞在螢光顯微鏡下之觀察結果。藍色：DAPI，綠色：NucGreen® Dead reagent。（Scale bar = 100 μm ）。



第五章 結論與未來展望

5.1 結論

Liver-on chip 主要目的是在體外建立一個能夠真實模仿人類肝臟功能的測試平台。而由既往研究得知，目前於 Liver-on chip 研究上所使用之細胞來源不論是初代細胞或是細胞系皆有其應用之限制 (Wilkening, Stahl and Bader, 2003) ，但幹細胞的發展讓這樣的限制有了解決的方法 (van der Meer *et al.*, 2012) ，而幹細胞中又以肝前驅細胞為一目前相對較優勢的潛在細胞來源 (Lee *et al.*, 2015) 。但肝前驅細胞之取得大多需要預先對大鼠之肝臟進行化學或是物理性的損傷處理以刺激前驅細胞之產生 (Fausto *et al.*, 2003) ，而本研究擬用一簡單離心之方式，不用對老鼠進行損傷處理即可成功的於大鼠中分離並採取肝前驅細胞，這樣的細胞相信能夠供給未來作為以微流道系統建立的 Liver-on chip 之細胞來源；而另一方面，本研究以 PMMA 作為微流道的基材而非一般使用的 PDMS ，而 PMMA 所需之製程時間 (約 3-4 小時) ，相較 PDMS 的製程時間 1-2 天 (Whitesides, 2006) 確實有其相對的便利性。此外，我們也可以用一般市售的簡單設備 (如：商用微波爐) 即可將 PMMA 微流道黏合，且此微流道亦具有一定的強度 (Rahbar *et al.*, 2009)。這些都是以 PMMA 做為微流道基材的優勢。

實驗結果證實：

1. 在調整過往小型肝細胞的分離及採取步驟 (由 150 g 、 5 分鐘、 4 °C ，取上清液，改為 150 g 、 5 分鐘、 4 °C ，取 Cell pellet) ，所得到的細胞大多具 CK19 之表現，而 CK18 之表現相對較少，我們因此可得知在我們的分離步驟下所得之細胞大多具前驅細胞機能之表現，而其細胞的型態亦和前人 (Ishii *et al.*, 2017) 所提及的之群聚、向上堆疊的生長型態相似。
2. 在 2D 培養環境下，相較成熟肝細胞在培養 7 天後有較明顯的 EMT 的機制而使肝細胞逐漸失去其特徵，小型肝細胞由於會形成聚落，因此可存活至少一個月。且隨著培養時間之增加，小型肝細胞聚落之 CK18 表現亦增加，表



- 示其有分化為成熟肝細胞的趨勢。
3. 根據 qPCR，NGS 結果，小型肝細胞在長時間培養下能維持一定的肝機能，且有分化為成熟肝細胞的趨勢，而白蛋白分泌量之結果亦和 qPCR 之結果相符。
 4. 我們亦利用 PMMA 製作出可供細胞培養的微流道晶片，而其製程較 PDMS 快速又低成本，而小型肝細胞於 PMMA 晶片上培養一天後，與傳統 2D 培養相比生存率較高約 27 %。

總的來說，小型肝細胞能於體外長時間培養且能維持機能，以這類前驅細胞作為 Liver-on chip 作為細胞來源相信是之後的趨勢也是我們所努力的目標；另一方面，PMMA 微流道作為一製程簡單而快速的微流道系統，具潛力成為 Liver-on chip 的開發平台之一。最終我們亦會以 Liver-on chip 建立的經驗嘗試 Mouse-on chip 的檢測平台，以提供一個取代活體實驗的可能性，並對未來建立人體器官晶片的平臺作準備。

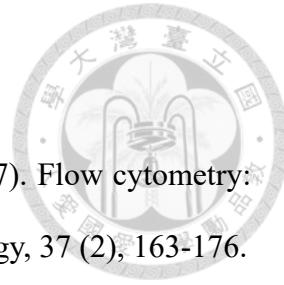


5.2 未來展望

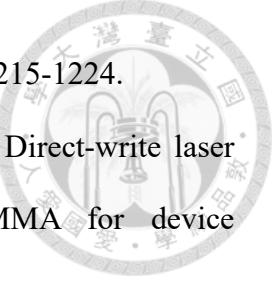
在之後實驗中，本研究會接著確認小型肝細胞之分離方式的確效性，除了利用前文所採用經 Cytocentrifuge 後，利用免疫染色方式於螢光顯微鏡下所觀察所得到的定性結果外，亦希望利用 Flow Cytometer 將細胞懸浮液組成進一步的得到定量的結果 (Adan *et al.*, 2017)。可以將其結果與利用流式細胞儀 (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) 分離之結果 (Ishii *et al.*, 2017) 進行分離效果的比較。也希望能分析培養天數更長 (> 14 天) 之細胞機能表現，並確認有分化為成熟肝細胞潛能的小型肝細胞是否能維持其活性並超過前人所提及之 7 天體外生存情況 (Choi and Diehl, 2009; Zeisberg *et al.*, 2007)。

另一方面，本研究希望能進一步的探討小型肝細胞長期培養於 PMMA 與 PDMS 微流道上之細胞形態及細胞活性、機能的差異性與 PDMS，藉由這些比較，希望可更進一步模仿體內肝臟細胞於體外微流道之分佈情形：例如參照 Ljupcho Prodanov 利用雙層流道之結構進而模擬血管中之養份需經滲透才能到達肝實質細胞的生理現象。另外一方面，相較前人研究在非實質細胞部份利用 Cell line 進行共培養 (Prodanov *et al.*, 2016)，我們更希望能用初代細胞來進行共培養 (例如類洞內皮細胞等)，以更模擬體內細胞的交互作用。最後，我們亦會進一步利用 NGS 及 qPCR 等方式，將在微流道上培養不同時間長之肝細胞與大鼠體內之肝細胞的基因表現進行比較，試著找出與體內的肝細胞的基因表現最相似的培養時間，作為最適化的培養時間，希望進一步的可以供後續的藥物測試使用。

參考文獻

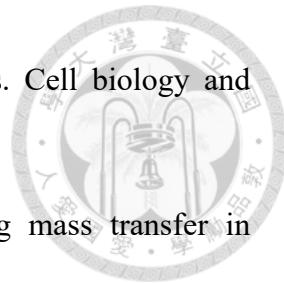


1. Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology*, 37 (2), 163-176.
2. Almazroo, O. A., Miah, M. K., & Venkataraman, R. (2017). Drug metabolism in the liver. *Clinics in liver disease*, 21 (1), 1-20.
3. Au, S. H., Chamberlain, M. D., Mahesh, S., Sefton, M. V., & Wheeler, A. R. (2014). Hepatic organoids for microfluidic drug screening. *Lab on a Chip*, 14 (17), 3290-3299.
4. Avril, A., Pichard, V., Bralet, M. P., & Ferry, N. (2004). Mature hepatocytes are the source of small hepatocyte-like progenitor cells in the retrorsine model of liver injury. *Journal of hepatology*, 41 (5), 737-743.
5. Becker, H., & Heim, U. (2000). Hot embossing as a method for the fabrication of polymer high aspect ratio structures. *Sensors and Actuators A: Physical*, 83 (1-3), 130-135.
6. Becker, H., & Locascio, L. E. (2002). Polymer microfluidic devices. *Talanta*, 56 (2), 267-287.
7. Brister, P. C., & Weston, K. D. (2005). Patterned solvent delivery and etching for the fabrication of plastic microfluidic devices. *Analytical chemistry*, 77(22), 7478-7482.
8. Carrel, A. (1912). Pure cultures of cells. *Journal of Experimental Medicine*, 16 (2), 165-168.
9. Chen, Q., Kon, J., Ooe, H., Sasaki, K., & Mitaka, T. (2007). Selective proliferation of rat hepatocyte progenitor cells in serum-free culture. *Nature protocols*, 2 (5), 1197.
10. Chen, Y. H., Chang, M. H., Chien, C. S., Wu, S. H., Yu, C. H., & Chen, H. L. (2013). Contribution of mature hepatocytes to small hepatocyte-like progenitor cells in



retrorsine-exposed rats with chimeric livers. *Hepatology*, 57 (3), 1215-1224.

11. Cheng, J. Y., Wei, C. W., Hsu, K. H., & Young, T. H. (2004). Direct-write laser micromachining and universal surface modification of PMMA for device development. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 99 (1), 186-196.
12. Choi, S. S., & Diehl, A. M. (2009). Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. *Hepatology*, 50 (6), 2007-2013.
13. Dupont-Gillain, C. C., Nysten, B., & Rouxhet, P. G. (1999). Collagen adsorption on poly (methyl methacrylate): net-like structure formation upon drying. *Polymer international*, 48 (4), 271-276.
14. Eddings, M. A., & Gale, B. K. (2006). A PDMS-based gas permeation pump for on-chip fluid handling in microfluidic devices. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 16 (11), 2396.
15. Esch, E. W., Bahinski, A., & Huh, D. (2015). Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, 14 (4), 248.
16. Evaluate Pharma (2016) World Preview 2016, Outlook to 2022.
17. Fausto, N., & Campbell, J. S. (2003). The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mechanisms of development*, 120 (1), 117-130.
18. Fenwick, N., Griffin, G., & Gauthier, C. (2009). The welfare of animals used in science: How the “Three Rs” ethic guides improvements. *The Canadian Veterinary Journal*, 50 (5), 523.
19. Fu, C. Y., Tseng, S. Y., Yang, S. M., Hsu, L., Liu, C. H., & Chang, H. Y. (2014). A microfluidic chip with a U-shaped microstructure array for multicellular spheroid formation, culturing and analysis. *Biofabrication*, 6 (1), 015009.
20. Gerets, H. H. J., Tilmant, K., Gerin, B., Chanteux, H., Depelchin, B. O., Dhalluin, S., & Atienzar, F. A. (2012). Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers



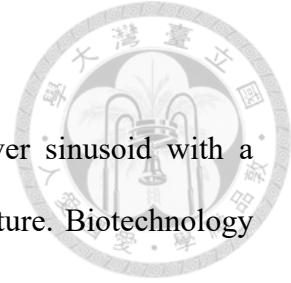
- and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell biology and toxicology*, 28 (2), 69-87.
21. Glicklis, R., Merchuk, J. C., & Cohen, S. (2004). Modeling mass transfer in hepatocyte spheroids via cell viability, spheroid size, and hepatocellular functions. *Biotechnology and bioengineering*, 86 (6), 672-680.
22. Gordon, G. J., Coleman, W. B., Hixson, D. C., & Grisham, J. W. (2000). Liver regeneration in rats with retrorsine-induced hepatocellular injury proceeds through a novel cellular response. *The American journal of pathology*, 156 (2), 607-619.
23. Haimes, J., & Kelley, M. (2010). Demonstration of a $\Delta\Delta C_q$ Calculation Method to Compute Relative Gene Expression from qPCR Data. Thermo Scientific Tech Note, 1-4.
24. Halldorsson, S., Lucumi, E., Gómez-Sjöberg, R., & Fleming, R. M. (2015). Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosensors and Bioelectronics*, 63, 218-231.
25. Harrison, R. G. (1910). The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 9 (4), 787-846.
26. Ho, C. T., Lin, R. Z., Chang, W. Y., Chang, H. Y., & Liu, C. H. (2006). Rapid heterogeneous liver-cell on-chip patterning via the enhanced field-induced dielectrophoresis trap. *Lab on a Chip*, 6 (6), 724-734.
27. Hou, Y. T., Ijima, H., Matsumoto, S., Kubo, T., Takei, T., Sakai, S., & Kawakami, K. (2010). Effect of a hepatocyte growth factor/heparin-immobilized collagen system on albumin synthesis and spheroid formation by hepatocytes. *Journal of bioscience and bioengineering*, 110 (2), 208-216.
28. Hou, Y. T., Ijima, H., Shirakigawa, N., Takei, T., & Kawakami, K. (2012). Development of growth factor-immobilizable material for hepatocyte



- transplantation. *Biochemical engineering journal*, 69, 172-181.
29. Huh, D., Hamilton, G. A., & Ingber, D. E. (2011). From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in cell biology*, 21 (12), 745-754.
30. Huh, D., Torisawa, Y. S., Hamilton, G. A., Kim, H. J., & Ingber, D. E. (2012). Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips. *Lab on a Chip*, 12 (12), 2156-2164.
31. Ishii, M., Kino, J., Ichinohe, N., Tanimizu, N., Ninomiya, T., Suzuki, H., Mizuguchi T., Hirata, K.... & Mitaka, T. (2017). Hepatocytic parental progenitor cells of rat small hepatocytes maintain self-renewal capability after long-term culture. *Scientific Reports*, 7.
32. Ishii, M., Kino, J., Ichinohe, N., Tanimizu, N., Ninomiya, T., Suzuki, H., Mizuguchi, T., Hirata, K., & Mitaka, T. (2017). Hepatocytic parental progenitor cells of rat small hepatocytes maintain self-renewal capability after long-term culture. *Scientific Reports*, 7, 46177.
33. Khetani, S. R., & Bhatia, S. N. (2008). Microscale culture of human liver cells for drug development. *Nature biotechnology*, 26 (1), 120.
34. Kim, L., Toh, Y. C., Voldman, J., & Yu, H. (2007). A practical guide to microfluidic perfusion culture of adherent mammalian cells. *Lab on a Chip*, 7 (6), 681-694.
35. Kimura, H., Sakai, Y., & Fujii, T. (2017). Organ/body-on-a-chip based on microfluidic technology for drug discovery. *Drug metabolism and pharmacokinetics*.
36. Kopec, A. M., Rivera, P. D., Lacagnina, M. J., Hanamsagar, R., & Bilbo, S. D. (2017). Optimized solubilization of TRIzol-precipitated protein permits Western blotting analysis to maximize data available from brain tissue. *Journal of neuroscience methods*, 280, 64-76.
37. Lee, K. H., Lee, J., & Lee, S. H. (2015). 3D liver models on a microplatform: well-defined culture, engineering of liver tissue and liver-on-a-chip. *Lab on a Chip*,

15 (19), 3822-3837.

38. Lee, P. J., Hung, P. J., & Lee, L. P. (2007). An artificial liver sinusoid with a microfluidic endothelial-like barrier for primary hepatocyte culture. *Biotechnology and bioengineering*, 97 (5), 1340-1346.
39. Lei, K. F., Ahsan, S., Budraa, N., Li, W. J., & Mai, J. D. (2004). Microwave bonding of polymer-based substrates for potential encapsulated micro/nanofluidic device fabrication. *Sensors and Actuators A: Physical*, 114 (2-3), 340-346.
40. Lin, C. H., Chao, C. H., & Lan, C. W. (2007). Low azeotropic solvent for bonding of PMMA microfluidic devices. *Sensors and Actuators B: chemical*, 121 (2), 698-705.
41. McGonigle, P., & Ruggeri, B. (2014). Animal models of human disease: challenges in enabling translation. *Biochemical pharmacology*, 87 (1), 162-171.
42. Mehling, M., & Tay, S. (2014). Microfluidic cell culture. *Current opinion in Biotechnology*, 25, 95-102.
43. Mitaka, T., Kojima, T., Mizuguchi, T., & Mochizuki, Y. (1995). Growth and maturation of small hepatocytes isolated from adult rat liver. *Biochemical and biophysical research communications*, 214 (2), 310-317.
44. Mizuguchi, T., Mitaka, T., Hirata, K., Oda, H., & Mochizuki, Y. (1998). Alteration of expression of liver-enriched transcription factors in the transition between growth and differentiation of primary cultured rat hepatocytes. *Journal of cellular physiology*, 174 (3), 273-284.
45. Nema, R., & Khare, S. (2012). An animal cell culture: Advance technology for modern research. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3 (3), 219.
46. Pang, K. S. (2003). Modeling of intestinal drug absorption: roles of transporters and metabolic enzymes (for the Gillette Review Series). *Drug metabolism and disposition*, 31 (12), 1507-1519.





47. Park, J. K., & Lee, D. H. (2005). Bioartificial liver systems: current status and future perspective. *Journal of bioscience and bioengineering*, 99 (4), 311-319.
48. Petri, R. J. (1887). Eine kleine Modification des Koch'schen Plattenverfahrens (A small modification of Koch's plate method). *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*, 1 : 279–280.
49. PhRMA (2017) The Pharmaceutical Industry and Global Health. Facts and Figures 2017.
50. Prodanov, L., Jindal, R., Bale, S. S., Hegde, M., McCarty, W. J., Golberg, I., Bhushan, A., Yarmush, M.L., & Usta, O. B. (2016). Long-term maintenance of a microfluidic 3D human liver sinusoid. *Biotechnology and bioengineering*, 113 (1), 241-246.
51. Rahbar, M., Chhina, S., Sameoto, D., & Parameswaran, M. (2009). Microwave-induced, thermally assisted solvent bonding for low-cost PMMA microfluidic devices. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 20 (1), 015026.
52. Rajendran, D., Hussain, A., Yip, D., Parekh, A., Shrirao, A., & Cho, C. H. (2017). Long-term liver-specific functions of hepatocytes in electrospun chitosan nanofiber scaffolds coated with fibronectin. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*.
53. Roberts, E. F. (2014). Petri Dish. *Commonplaces, Somatosphere*, March, 31.
54. Ronken, S. (2009). Influence of material choice and surface structure on cell behaviour.
55. Russell, W. M. S., Burch, R. L., & Hume, C. W. (1959). The principles of humane experimental technique.
56. Seglen, P. O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods in cell biology*, 13, 29-83.
57. Seok, J., Warren, H. S., Cuenca, A. G., Mindrinos, M. N., Baker, H. V., Xu, W.,

Richards, D., McDonald-Smith, G, Gao, H., Hennessy, L., Honari, S., ... & Finnerty, C. C. Finnerty C.C., López, C.M., Honari, S., Moore, E.E., Minei, J.P., Cuschieri, J., Bankey, P.E., Johnson, J.L., Sperry, J., Nathens, A.B., Billiar T.R., West, M.A., Jeschke, M.G., Klein, M.B., Gamelli, R.L., Gibran, N.S., Brownstein, B.H., Miller-Graziano, C., Calvano, S.E., Mason, P.H., Cobb, J.P., Rahme, L.G., Lowry, S.F., Maier, R.V., Moldawer, L.L., Herndon, D.N., Davis, R.W., Xiao, W., Tompkins, R.G.; Inflammation and Host Response to Injury, Large Scale Collaborative Research Program. (2013). Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (9), 3507-3512.

58. Shibata, C., Mizuguchi, T., Kikkawa, Y., Nobuoka, T., Oshima, H., Kawasaki, H. & Hirata, K. (2006). Liver repopulation and long-term function of rat small hepatocyte transplantation as an alternative cell source for hepatocyte transplantation. *Liver transplantation*, 12 (1), 78-87.
59. Stella, V. J. (2004). Prodrugs as therapeutics.
60. van der Meer, A. D., & van den Berg, A. (2012). Organs-on-chips: breaking the in vitro impasse. *Integrative Biology*, 4 (5), 461-470.
61. Wang, J., Pumera, M., Chatrathi, M. P., Escarpa, A., Konrad, R., Griebel, A., Dörner, W., & Löwe, H. (2002). Towards disposable lab-on-a-chip: Poly (methylmethacrylate) microchip electrophoresis device with electrochemical detection. *Electrophoresis*, 23 (4), 596-601.
62. Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, 10 (1), 57.
63. Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442 (7101), 368.



64. Wikswo, J.P., Block, F.E. 3rd, Cliffel, D.E., Goodwin, C.R., Marasco, C.C., Markov, D.A., et al. 2013. Engineering Challenges for Instrumenting and Controlling Integrated Organ-on-Chip Systems. *IEEE Trans Biomed Eng*, 60 , 682-690.
65. Wilkening, S., Stahl, F., & Bader, A. (2003). Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug metabolism and disposition*, 31 (8), 1035-1042.
66. Xu, J., Locascio, L., Gaitan, M., & Lee, C. S. (2000). Room-temperature imprinting method for plastic microchannel fabrication. *Analytical Chemistry*, 72 (8), 1930-1933.
67. Yamada, M., Utoh, R., Ohashi, K., Tatsumi, K., Yamato, M., Okano, T., & Seki, M. (2012). Controlled formation of heterotypic hepatic micro-organoids in anisotropic hydrogel microfibers for long-term preservation of liver-specific functions. *Biomaterials*, 33 (33), 8304-8315.
68. Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., & Slukvin, I. I., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318 (5858), 1917-1920.
69. Yu, L., Chen, M. C., & Cheung, K. C. (2010). Droplet-based microfluidic system for multicellular tumor spheroid formation and anticancer drug testing. *Lab on a Chip*, 10 (18), 2424-2432.
70. Zeilinger, K., Freyer, N., Damm, G., Seehofer, D., & Knöspel, F. (2016). Cell sources for in vitro human liver cell culture models. *Experimental Biology and Medicine*, 241 (15), 1684-1698.
71. Zeisberg, M., Yang, C., Martino, M., Duncan, M. B., Rieder, F., Tanjore, H., & Kalluri, R. (2007). Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (32), 23337-23347.