



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108504571 B

(45) 授权公告日 2021.12.31

(21) 申请号 201810313518.9

(22) 申请日 2018.04.10

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108504571 A

(43) 申请公布日 2018.09.07

(66) 本国优先权数据
201810192717.9 2018.03.09 CN

(73) 专利权人 清华大学深圳研究生院
地址 518055 广东省深圳市南山区西丽大
学城清华校区

(72) 发明人 弥胜利 孙伟 李柏翰 李伟
易晓满 徐圆圆 蒲海涛 夏圣悦

(74) 专利代理机构 广东德而赛律师事务所
44322
代理人 叶秀进

(51) Int. Cl.
C12M 3/00 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)

(56) 对比文件
CN 106581761 A, 2017.04.26

CN 106581761 A, 2017.04.26

CN 105176816 A, 2015.12.23

CN 103614297 A, 2014.03.05

CN 105170205 A, 2015.12.23

CN 107502547 A, 2017.12.22

US 2013236972 A1, 2013.09.12

WO 2007124481 A2, 2007.11.01

Seung-A Lee et al..Spheroid-based three-dimensional liver-on-a-chip to investigate hepatocyte-hepatic stellate cell interactions and flow effects.《Lab Chip》.2013,第13卷(第18期),
Shengli Mi et al..Construction of a liver sinusoid based on the laminar flow on chip and self-assembly of endothelial cells.《Biofabrication》.2018,第10卷
Amin A Banaeiyan et al..Design and fabrication of a scalable liver-lobule-on-a-chip microphysiological platform.《Biofabrication》.2017,第9卷 (续)

审查员 孙昊

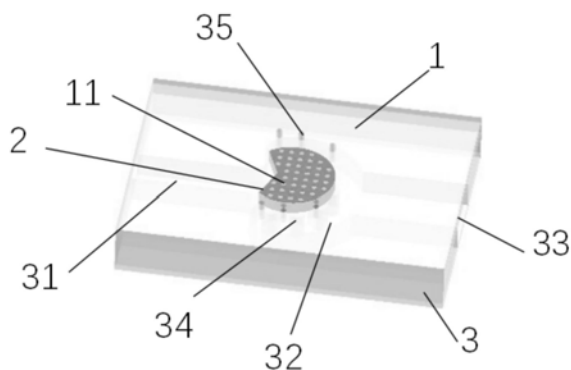
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称
一种人工肝小叶功能单元的构建装置及构建方法

(57) 摘要

本发明公开了一种肝小叶功能单元的构建装置及构建方法。该装置包括肝板基层层、肝实质细胞区、流体通道层,所述肝板基层层上加工有肝板图案化凹槽,所述流体通道层包括流体入口通道、内皮细胞定向生长区、流体出口通道。其对应的构建方法为将含有肝实质细胞的胶原铺设到肝板图案化凹槽内部,待胶原凝固后将肝板基层层和流体通道层键合,在内皮细胞定向生长区灌入内皮细胞悬液,内皮细胞增长一定数量后,使细胞培养基溶液在流体入口通道、内皮细胞定向生长区及流体出口通道单向流动。本发明

在动态培养下实现了内皮层与肝实质细胞真实的层与层之间的位置关系,肝实质细胞在血管内皮层的保护下对于理化和生化刺激的反应更加趋于真实,当应用于药物筛选、病例研究和疗法检测时,可以得到更加准确的结果。



CN 108504571 B

[接上页]

(56) 对比文件

Shengli Mi et al..An AC electrothermal self-circulating system with a minimalist process to construct a biomimetic liver lobule model for drug

testing.《RSC Advances》.2018,第8卷

李柏翰.基于交流电热的自循环药检肝小叶模型构建研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 工程科技II辑》.2020,(第6期),

1. 一种人工肝小叶功能单元的构建装置,由自下而上依次组合在一起的肝板基层、肝实质细胞区、流体通道层组成,其特征在于:所述肝板基层上加工有肝板图案化凹槽,所述流体通道层包括流体入口通道、内皮细胞定向生长区、流体出口通道,所述肝实质细胞区铺设在所述肝板图案化凹槽内,肝实质细胞区内的细胞填充物呈凝胶状,细胞填充物的顶部直接暴露在内皮细胞定向生长区底部;所述肝板图案化凹槽内部设置有微柱阵列,微柱的高度为 $10\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$,微柱的直径为 $10\mu\text{m}\sim 500\mu\text{m}$,微柱的间距为 $10\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$,肝板图案化凹槽的直径尺寸为 $100\mu\text{m}\sim 10\text{mm}$;所述流体通道层和肝板基层的扣合关系为肝实质细胞区和内皮细胞定向生长区的几何中心相对应。

2. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于:在内皮细胞定向生长区对应的肝板基层或流体通道层中设置有内皮细胞悬液灌入通道,所述内皮细胞悬液灌入通道的数量大于等于2个,在内皮细胞悬液灌入通道口还设置有密封片。

3. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于:内皮细胞定向生长区被流道壁分割为扇型多支流域,所述多支流域起源于所述流体入口通道,汇聚于所述流体出口通道。

4. 根据权利要求3所述的装置,其特征在于:所述扇形多支流域的分支流域宽度为 $10\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$,深度为 $10\mu\text{m}\sim 2000\mu\text{m}$ 。

5. 一种人工肝小叶功能单元的构建方法,其特征在于:

S1,准备权利要求1-4任一项所述的人工肝小叶功能单元的构建装置中的肝板基层、流体通道层;

S2,将混有肝实质细胞的胶原铺设到肝板图案化凹槽内部,刮平;

S3,待胶原凝胶化后将肝板基层与流体通道层进行键合;

S4,将含有内皮细胞的悬液灌入流体通道层中,封闭整个装置;

S5,然后放入培养器中培养,内皮细胞增长,得到人工肝小叶功能单元。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于:S4的具体步骤为先封闭流体入口通道和流体出口通道,再将含有内皮细胞的悬液通过内皮细胞悬液灌入通道灌入内皮细胞定向生长区,最后用密封片密封内皮细胞悬液灌入通道口,从而封闭整个装置。

7. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于:包括如下后续步骤,打开流体入口通道和流体出口通道,将细胞培养基溶液导入流体入口通道中,细胞培养基溶液从流体入口通道流入内皮细胞定向生长区,再从流体出口通道流出,内皮细胞和肝实质细胞在细胞培养基溶液流动的环境中生长。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于:还包括如下后续步骤,细胞培养基溶液移除,通入加有药物的细胞培养基溶液,使内皮细胞和肝实质细胞在加药的细胞培养基溶液流动环境下生长,得到药物筛选和代谢功能检测的实验数据。

9. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于:控制所述细胞培养基溶液的流速为 $0.1\sim 100\mu\text{m}/\text{s}$ 。

一种人工肝小叶功能单元的构建装置及构建方法

技术领域

[0001] 本发明涉及肝脏组织工程和生物人工肝领域,尤其涉及一种人工肝小叶功能单元的构建装置及构建方法。

背景技术

[0002] 组织工程和再生医学的研究集成了多领域包括生命科学和工程技术的应用来制造功能性的人体组织。肝组织工程的发展目的是给肝功能损伤患者提供活体移植或做肝功能相关的功能检测、药物代谢和毒性测试等。传统的构建方式是通过自上而下的构建方法,即肝细胞移植到一个多聚物支架上,在细胞基质的作用下进行定向生长。然而,这种方式不能很好的在微结构上构建一个精确的体外细胞群体。相对而言自下而上的构建方式可以从肝脏的最小单元进行构建,然后进行重组实现金字塔形式的堆积。

[0003] 肝小叶作为肝脏功能性的基本单元,其形态具有辐射状的结构,它包含了肝脏具有的基本代谢功能、物质传递以及部分免疫功能等。目前,Ma Chao等人通过构建一套双通道气动微流控芯片,实现了气动模型内肝细胞和内皮细胞的结构化共培养(Chao M,Lei Z,Zhou E M,et al.On-Chip Construction of Liver Lobule-like Microtissue and Its Application for Adverse Drug Reaction Assay[J].Analytical Chemistry,2016,88(3):1719.)。Ho等人通过在微芯片上制作电极,通过通电位点的改变选择性吸附肝细胞和内皮细胞实现肝小叶结构的图案化(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.)。Ma等人通过细胞悬液与光敏材料的混合配制成细胞胶体,在掩模板的覆盖下实现了选择性区域的光固化(Ma X,Qu X,Zhu W,et al.Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3Dbioprinting.[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2016,113(8):2206.)。目前的肝小叶功能单元的构建方法存在一个严重的缺陷,即内皮层与肝实质细胞层位于同一平面,而实际中物质传递的方向是通过内皮层传向肝实质细胞,内皮层在一定程度上起到保护肝实质细胞的作用,使肝实质细胞避免受到层流的冲刷。由于上述原因,导致现有的肝小叶模型用于药物筛选和代谢功能检测是具有一定的偏差。

[0004] 中国发明CN105170205B(公开日:2017年1月25日)公开了一种基于微流控芯片技术构建的仿生芯片,它利用多孔膜将消除模块、分布模块、药效模块及第一、第二肝代谢模块及吸收模块叠加在一起,构成自上而下的一体结构,用于评价药物的吸收、分布、代谢、消除、药效和肝毒性。然而,多孔膜将在一定程度上阻碍两种细胞间的物质传输能力,也将影响药物筛选和代谢功能检测的结果。

发明内容

[0005] 本发明的主要目的在于克服现有技术的不足,提供一种人工肝小叶功能单元的构

建装置及构建方法。本发明构建的肝小叶功能单元,仿生了肝小叶真实的结构,使得本发明用于药物筛选和代谢功能检测时具有更真实的实验数据。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0007] 一种人工肝小叶功能单元的构建装置,包括自下而上依次组合在一起的肝板基层、肝实质细胞区、流体通道层,所述肝板基层上加工有肝板图案化凹槽,所述流体通道层包括流体入口通道、内皮细胞定向生长区、流体出口通道,所述肝实质细胞区铺设在所述肝板图案化凹槽内,肝实质细胞区内的细胞填充物呈凝胶状,细胞填充物的顶部直接暴露在内皮细胞定向生长区底部。

[0008] 作为本发明改进的技术方案,在内皮细胞定向生长区对应的肝板基层或流体通道层中设置有内皮细胞悬液灌入通道,所述内皮细胞悬液灌入通道的数量大于等于2个,在内皮细胞悬液灌入通道口还设置有密封片。

[0009] 作为本发明改进的技术方案,所述肝板图案化凹槽内部设置有微柱阵列,微柱的高度为 $10\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$,微柱的直径为 $10\mu\text{m}\sim 500\mu\text{m}$,微柱的间距为 $10\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$,肝板图案化凹槽的直径尺寸为 $100\mu\text{m}\sim 10\text{mm}$ 。

[0010] 作为本发明改进的技术方案,内皮细胞定向生长区被流道壁分割为扇型多支流域,所述多支流域起源于所述流体入口通道,汇聚于所述流体出口通道。

[0011] 优选地,所述扇形多支流域的分支流域宽度为 $10\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$,深度为 $10\mu\text{m}\sim 2000\mu\text{m}$ 。

[0012] 进一步地,所述流体通道层和肝板基层的扣合关系为肝实质细胞区和内皮细胞定向生长区的几何中心相对应。

[0013] 作为本发明的另一目的,提供一种人工肝小叶功能单元的构建方法,包括:

[0014] S1,准备上述的人工肝小叶功能单元的构建装置中的肝板基层、流体通道层;

[0015] S2,将混有肝实质细胞的胶原铺设到肝板图案化凹槽内部,刮平;

[0016] S3,待胶原凝胶化后将肝板基层与流体通道层进行键合;

[0017] S4,将含有内皮细胞的悬液灌入流体通道层中,封闭整个装置;

[0018] S5,然放入培养器中培养,内皮细胞增长,得到人工肝小叶功能单元。

[0019] 作为本发明改进的技术方案,S4的具体步骤为先封闭流体入口通道和流体出口通道,再将含有内皮细胞的悬液通过内皮细胞悬液灌入通道灌入内皮细胞定向生长区,最后用密封片密封内皮细胞悬液灌入通道口,从而封闭整个装置。

[0020] 作为本发明改进的技术方案,包括如下后续步骤,打开流体入口通道和流体出口通道,将细胞培养基溶液导入流体入口通道中,细胞培养基溶液从流体入口通道流入内皮细胞定向生长区,再从流体出口通道流出,内皮细胞和肝实质细胞在细胞培养基溶液流动的环境中生长。

[0021] 作为本发明进一步改进的技术方案,还包括如下后续步骤,细胞培养基溶液移除,通入加有药物的细胞培养基溶液,使内皮细胞和肝实质细胞在加药的细胞培养基溶液流动环境下生长,得到药物筛选和代谢功能检测的实验数据。

[0022] 作为本发明改进的技术方案,控制所述细胞培养基溶液的流速为 $0.1\sim 100\mu\text{m}/\text{s}$ 。

[0023] 作为本发明改进的技术方案,肝实质细胞区内的细胞填充物是通过胶原与肝细胞悬液混合制成,单个肝小叶功能单元中的肝细胞含量为 $1\text{e}^2\sim 1\text{e}^6$ 个。

[0024] 进一步地,所述胶原具有良好的生物相容性。

[0025] 优选地,所述胶原为鼠尾I型胶原或者明胶海藻酸钠体系的一种或多种混合,胶原的最终浓度在1~10mg/ml。

[0026] 作为本发明改进的技术方案,单个肝小叶功能单元中灌入的内皮细胞悬液的内皮细胞含量是 $1e^2 \sim 1e^4$ 个。

[0027] 作为本发明改进的技术方案,所述细胞培养基溶液由肝细胞培养基溶液和内皮细胞培养基溶液混合而成,肝细胞培养基溶液与内皮细胞培养基溶液的体积比为0.1~10:1。

[0028] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0029] (1) 以往构建的肝实质细胞与内皮细胞在同一层,此模型构建的肝实质细胞与内皮细胞的位置是空间结构关系,当内皮细胞的密度达到一定程度时,内皮层可以实现类血管层的功能。

[0030] (2) 以往的模型没有将肝小叶模型与动力传输组装到一起,该模型可以实现流体对内皮层生长的促进作用,同时保护肝实质细胞避免受到流体剪切力的影响。

[0031] (3) 以往的夹层结构都是采用PET、多孔硅等结构实现两种细胞的接触培养,该模型直接实现了两种细胞接触式培养的模式构建,提高了模型的物质传输能力。

[0032] 综上所述,本发明提供的人工肝小叶功能单元的构建装置及构建方法,构建的肝小叶功能单元包含有肝小叶最基本的肝实质细胞和内皮细胞两种必要细胞的共培养,在动态培养下实现了内皮层与肝实质细胞真实的层与层之间的位置关系,肝实质细胞在血管内皮层的保护下对于理化和生化刺激的反应更加趋于真实,当应用于药物筛选、病例研究和疗法检测时,可以得到更加准确的结果。此外,本发明还实现了多通道的层流模型构建,许多独立的单元在一张芯片上汇成一体,可以同时观测多个独立单元,又可以集中提取溶液进行研究。例如用于肝细胞的功能检测时,可以将芯片进行破坏,单独提取肝细胞做进一步的研究。

附图说明

[0033] 图1为本发明装置键合结构示意图;

[0034] 图2为本发明装置分体结构示意图;

[0035] 图3为含有肝细胞的胶原铺设示意图;

[0036] 图4为内皮细胞悬液灌注示意图;

[0037] 图5为肝实质细胞和内皮细胞分布示意图;

[0038] 图6为显微镜下的肝实质细胞和内皮细胞分布观察图。

具体实施方式

[0039] 为了使本领域的技术人员清楚了地理解本发明,现结合具体实施方式和说明书附图,对本发明进行详细说明。

[0040] 实施例1

[0041] 参阅图1-2,本发明的人工肝小叶功能单元的构建装置,包括自下而上依次组合在一起的肝板基层1、肝实质细胞区2、流体通道层3,所述肝板基层1上加工有肝板图案化凹槽,所述流体通道层3包括流体入口通道31、内皮细胞定向生长区32、流体出口通道33,所

述肝实质细胞区2铺设在所述肝板图案化凹槽内,肝实质细胞区2内的细胞填充物呈凝胶状,细胞填充物的顶部直接暴露在内皮细胞定向生长区32底部。

[0042] 在述肝板图案化凹槽内部设置有微柱阵列,微柱11的高度为 $10\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$,微柱11的直径为 $10\mu\text{m}\sim 500\mu\text{m}$,微柱11的间距为 $10\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$,肝板图案化凹槽的直径尺寸为 $100\mu\text{m}\sim 10\text{mm}$ 。内皮细胞定向生长区被流道壁34分割为扇型多支流域,所述多支流域起源于所述流体入口通道31,汇聚于所述流体出口通道33。优选地,所述扇形多支流域的分支流域宽度为 $10\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$,深度为 $10\mu\text{m}\sim 2000\mu\text{m}$ 。流体通道层3和肝板基层1的扣合关系为肝实质细胞区2和内皮细胞定向生长区32的几何中心相对应。

[0043] 在优选的实施例中,所述的肝板基层1和流体通道层3都是通过PDMS(聚二甲基硅氧烷)倒模成型制备而成。

[0044] 将SU-8 2100光刻胶浇筑在已经预烘好的硅片上,分别在500rpm和1500rpm的转速下旋涂10s和30s,在 65°C 和 95°C 的烘板上分别进行烘烤6min和40min。在紫外光固化设备上进行有掩膜图案的紫外光固化30s,之后放到 65°C 和 95°C 的烘板上分别进行烘烤6min和20min。将烘烤后的硅片放到显影液内显影5min,用酒精清洗后用氮气吹干,放到 150°C 的烤板上进行烘烤。得到含有微孔的凹槽圆饼状图形模具。在优选的实施例中,所述的含有微孔的凹槽圆饼状图形其直径为2.5mm,微孔的直径为 $100\mu\text{m}$,微孔的间距为 $300\mu\text{m}$,槽与微孔的深度为 $400\mu\text{m}$ 。取20g PDMS混合液浇筑到含有微孔的凹槽圆饼状图形模具上,放入烘箱使其在 85°C 的氛围下烘烤30min。获得肝板基层1。在肝基层1对应于内皮细胞定向生长区32的位置打孔,制得内皮细胞悬液灌入通道36。

[0045] 类似地,将SU-8 2150光刻胶浇筑在已经预烘好的硅片上,分别在500rpm和1500rpm的转速下旋涂10s和30s,在 65°C 和 95°C 的烘板上分别进行烘烤10min和90min。在紫外光固化设备上进行紫外光固化30s后放到 65°C 和 95°C 的烘板上进行烘烤6min和20min,重复旋涂后烘步骤3次,分别采用不同掩膜版进行对准光刻。将烘烤后的硅片放到显影液内显影5min,用酒精清洗后用氮气吹干,放到 150°C 的烤板上进行烘烤。得到流道深度是1mm高的扇形多支流域流道模具。在优选的实施例中,所述的扇形多支流域流道模具对应的分支流道的宽度是 $200\mu\text{m}$,整个扇形多支流域的直径尺寸是3mm,如图5所示。将PDMS与固化剂按照10:1的比例进行混合,均匀混合好后将PDMS混合液放入到真空干燥皿内进行抽真空处理5min,取20g PDMS混合液浇筑到具有扇形多支流域流道模具的模板上,上面贴上一层平整的硅片使其处于夹层中,放入烘箱使其在 85°C 的氛围下烘烤30min。之后将PDMS取下来获得流体通道。

[0046] 将流体通道和玻璃板放到氧等离子清洗机内清洗30min,取出后将流体通道层3非工作面与玻璃板进行键合,放到烘箱内 85°C 烘烤30min,得到流体通道层3。

[0047] 将肝板基层1和流体通道层3进行酒精清洗,之后用PBS(磷酸盐缓冲液)进行冲洗晾干,在紫外光的照射下消毒60min。

[0048] 在优选的实施例中,将已经铺板的肝实质细胞HepG2用胰酶进行消化制备成细胞悬液1ml,取 $20\mu\text{L}$ 细胞悬液, $20\mu\text{L}$ 1X DMEM培养基溶液放入冰中充分降温,取 $3\mu\text{L}$ 1M的NaOH溶液加入到EP管当中,取10X DMEM培养基溶液 $11\mu\text{L}$ 加入其中充分混合后放入冰中降温,将降温后的 $100\mu\text{L}$ 鼠尾I型胶原混入到NaOH-10X DMEM培养基溶液当中,充分吹打,得到中和鼠尾胶原。冰浴操作将细胞悬液和1X DMEM培养基溶液加入到中和鼠尾胶原中。胶原的浓度为

3.5mg/ml,单个功能单元的细胞数量为 $1.0e^4$ 。

[0049] 取配好的胶原10 μ L铺设到肝板基层1的凹槽之内,用刮刀进行刮平,使其铺满凹槽之内,如图3所示。铺好后放到37 $^{\circ}$ C培养箱内进行固化30min处理。将流体通道层3放入氧等离子清洗机处理30s,工作面与肝板基层1进行键合。

[0050] 将已经铺板的内皮细胞HUVEC悬液用胰酶消化制备成细胞悬液10 μ L,取100 μ L细胞悬液通过内皮细胞HUVEC悬液灌入通道加入到流体通道层3使其充分与混肝细胞HepG2胶原接触,灌入后将PDMS薄片裁剪成1mm \times 1mm的正方形薄片制成密封片35,封堵在内皮细胞HUVEC悬液灌入通道的入口,如图4所示。将芯片倒置放入培养箱进行培养12h。

[0051] 将1X DMEM培养基溶液与1X RPMi培养基溶液按照1:1进行混合,通过外部接口将混合培养基溶液灌入到芯片内,使其单向连续流动。这里流速的设定为10 μ m/s。在培养箱中动态培养2天后,将内部的培养基溶液用移液枪吸出,之后再添加有药物的1X DMEM培养基溶液与1X RPMi培养基溶液加入到芯片内,使泵连续转动,从而观察药物对该模型的影响。肝实质细胞和内皮细胞分布示意图如图5所示,在显微镜下观察到的肝实质细胞和内皮细胞分布如图6所示。

[0052] 实施例2

[0053] 实施例2与实施例1基本相同,不同之处在于混有肝细胞HepG2的胶原的配制方法,称取1g明胶和0.1g海藻酸钠,倒入血清瓶中,用移液枪向血清瓶中加入10ml PBS溶液,用玻璃棒搅拌材料,使其尽可能的混合均匀,将材料放入70 $^{\circ}$ C的干燥箱中,每过30min取出冷却30min,反复重复3次。材料的浓度是10% (w/v),将已经铺板的肝细胞HepG2 100 μ L加入到胶原当中,进行充分搅拌。配好的混有肝细胞HepG2的胶原滴入肝板基层1(1)上,用细胞刮刀进行刮平,再滴入1% (w/v) 海藻酸钠进行固化处理,待胶原完全凝固,进行下一步操作。

[0054] 显然,上述实施例仅仅是为了清楚地说明所作的举例,而非对实施方式的限制。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。只要是在本发明实施例基础上做出的常识性的改动方案,都处于本发明的保护范围之内。

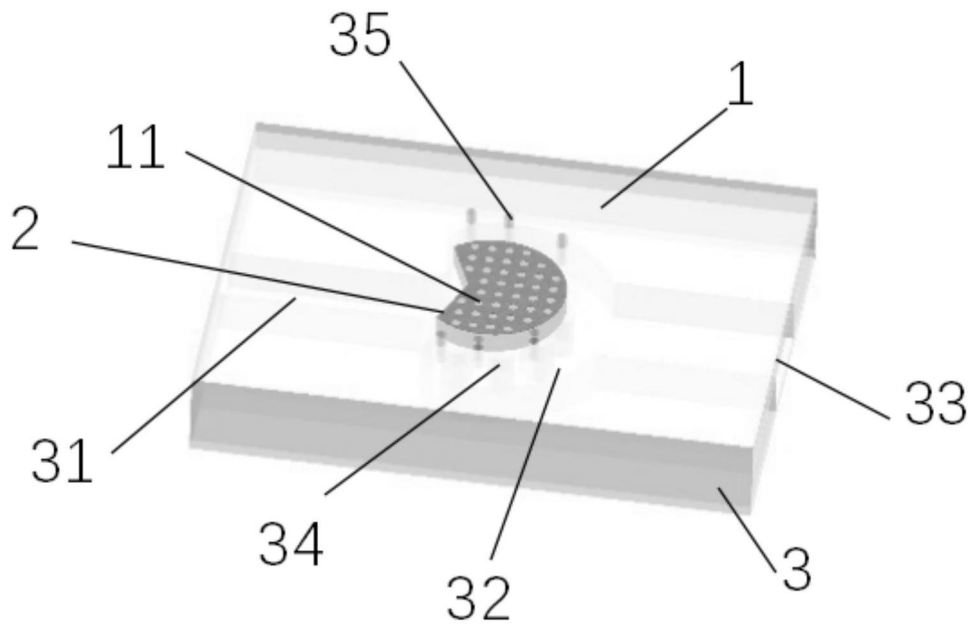


图1

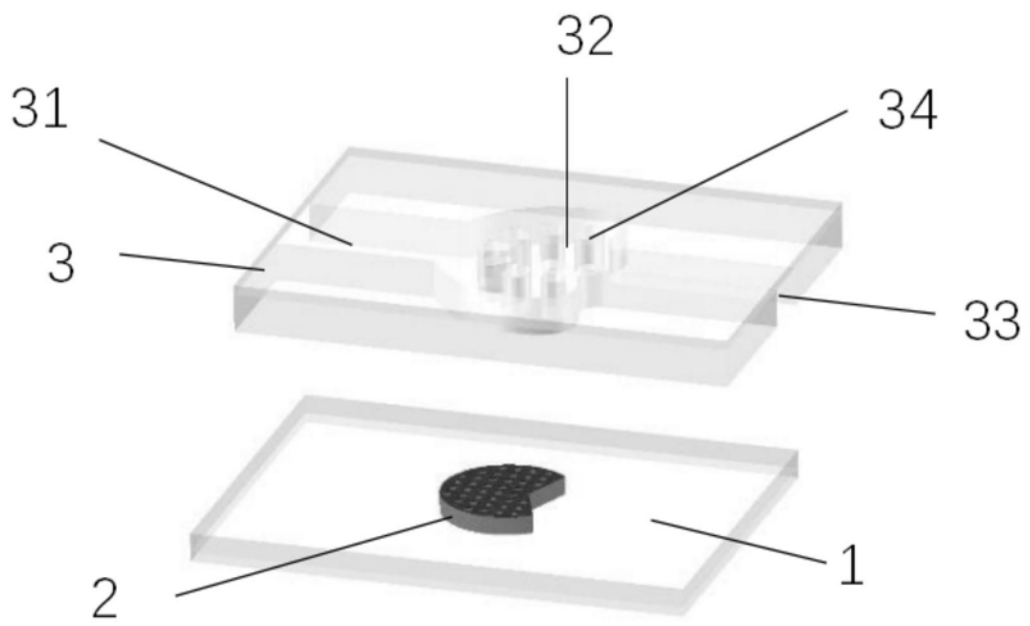


图2

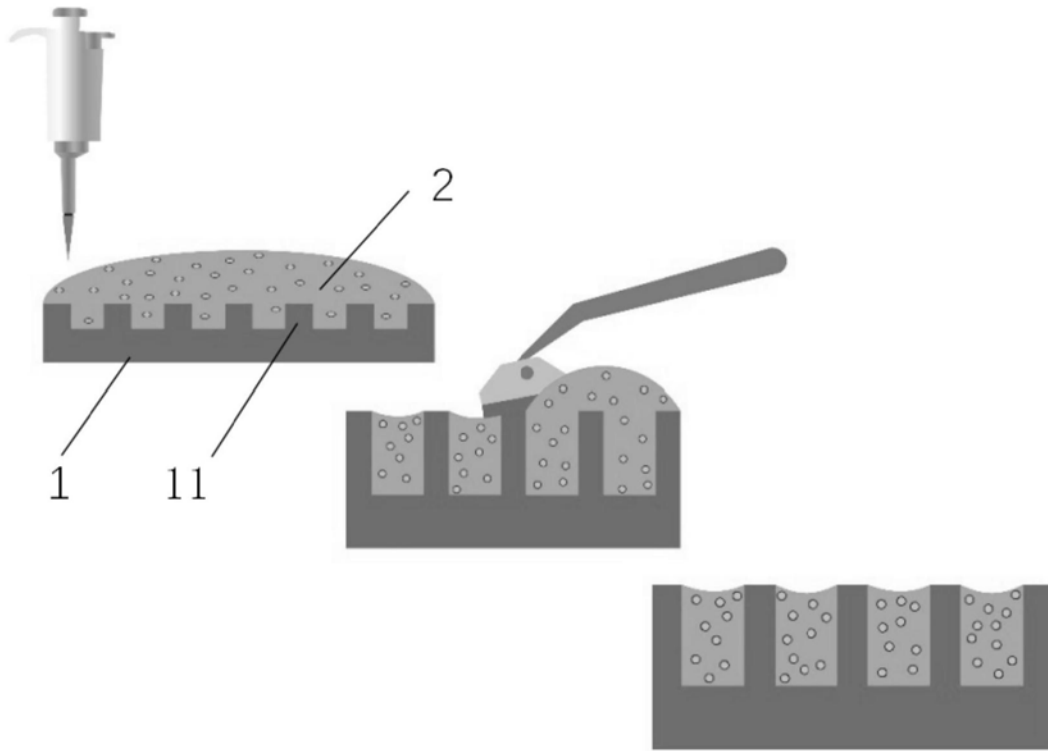


图3

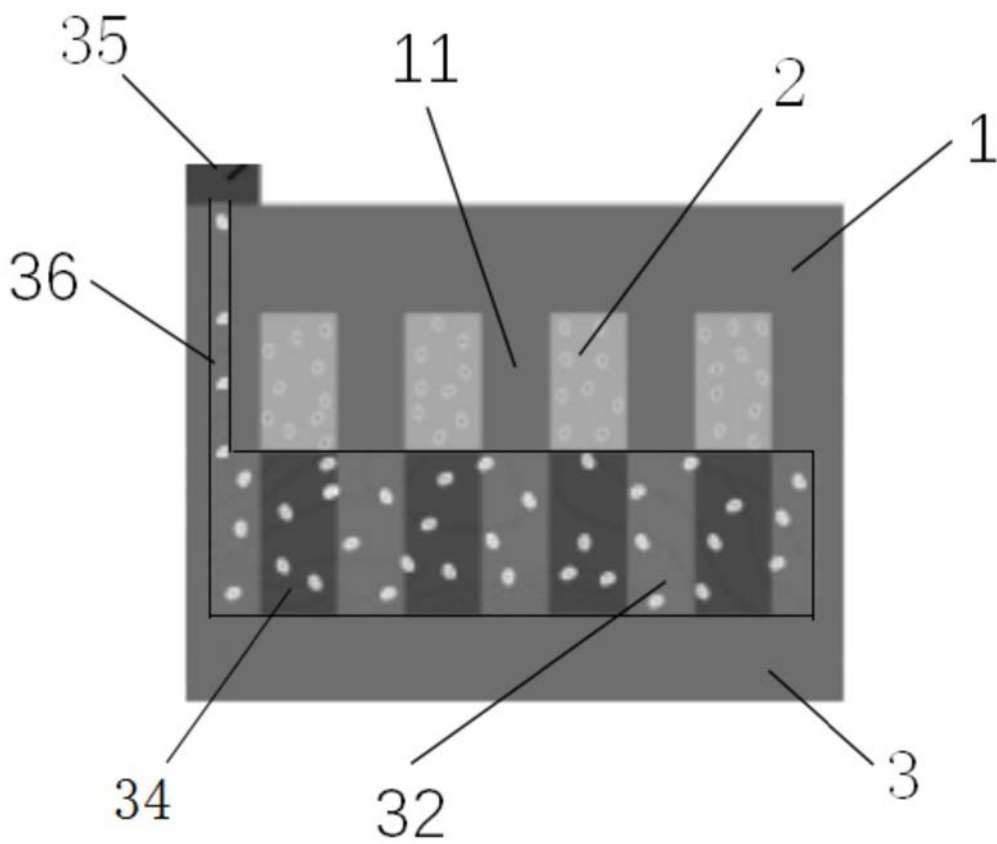


图4

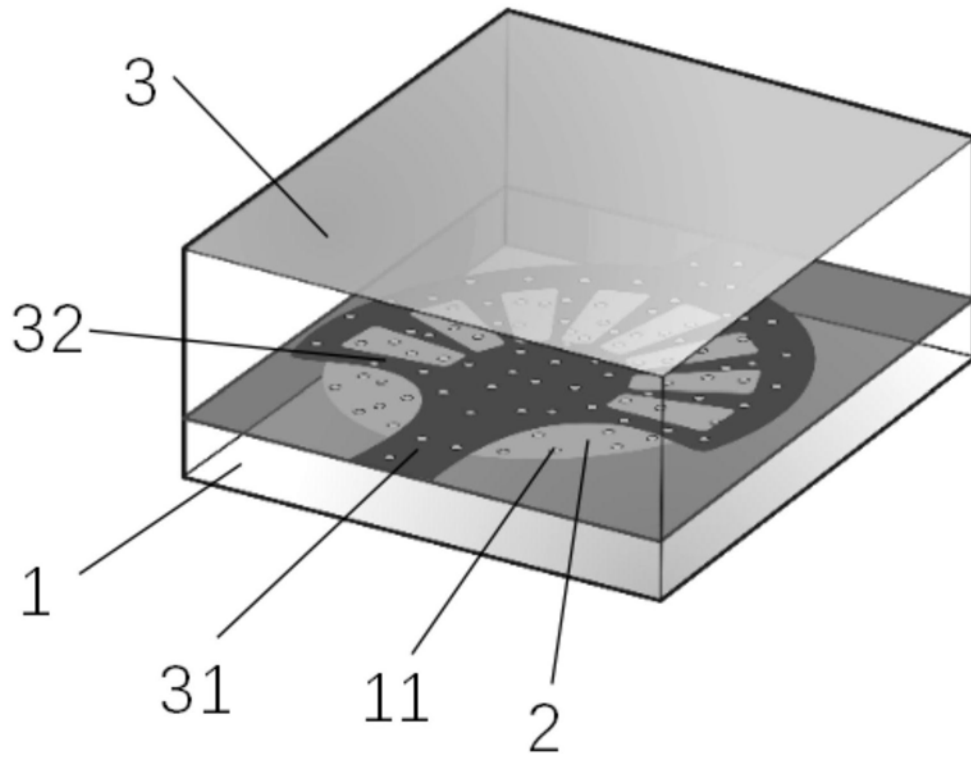


图5

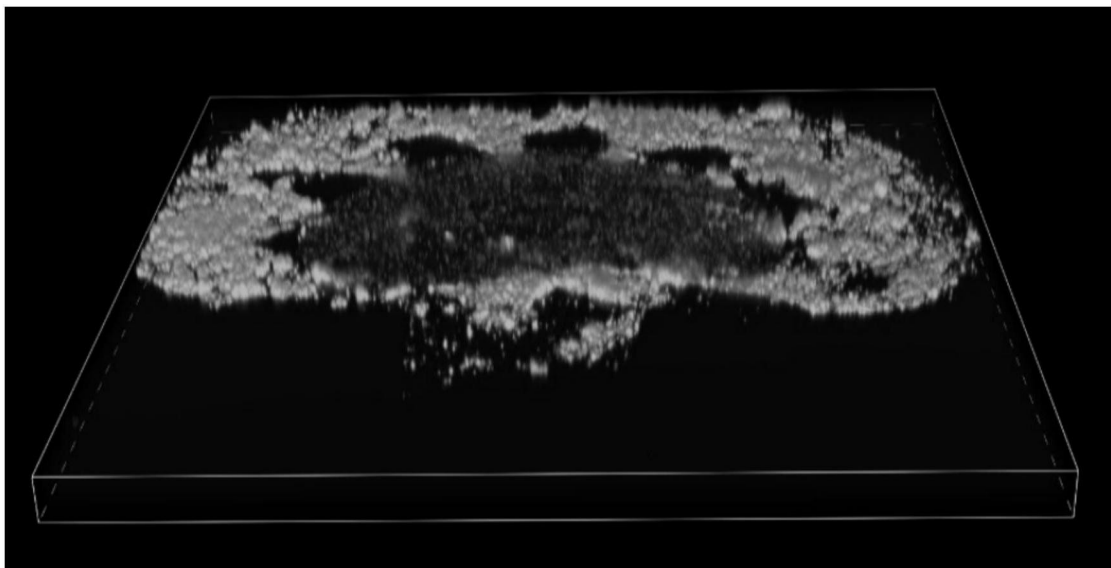


图6