

# 為什麼生物機械力 對細胞培養和功能很重要？

生物機械力能夠被細胞通過多種途徑感知，並且對細胞產生生物學效應。要研究這些作用力可能相關的生理和病理機制，就需要在體外充分類比這些機械力，在細胞培養中充分重構組織微環境特徵。下面我們將以荷蘭萊頓大學醫學中心Anne M. van der Does 課題組2023年6月份見刊的器官晶片呼吸研究論文為例探索生物機械力對細胞培養的重要性。

## 主要亮點

1. 比較了靜態培養、器官晶片不同機械力模式對細胞的影響
2. 展示和解釋了機械力促進細胞分化的狀態
3. 發現機械力對粘液纖毛清除功能的影響及纖毛方向的影響
4. 展現了機械力對炎症和ECM相關基因表達的影響

Materials Today Bio 21 (2023) 100713



Contents lists available at ScienceDirect

Materials Today Bio

journal homepage: [www.journals.elsevier.com/materials-today-bio](http://www.journals.elsevier.com/materials-today-bio)



## Breathing on chip: Dynamic flow and stretch accelerate mucociliary maturation of airway epithelium *in vitro*



Janna C. Nawroth<sup>a,b,c,d,1</sup>, Doris Roth<sup>b,1</sup>, Annemarie van Schadewijk<sup>e</sup>, Abilash Ravi<sup>e</sup>, Tengku Ibrahim Maulana<sup>b</sup>, Christiana N. Senger<sup>a</sup>, Sander van Riet<sup>e</sup>, Dennis K. Ninaber<sup>e</sup>, Amy M. de Waal<sup>f</sup>, Dorothea Kraft<sup>c</sup>, Pieter S. Hiemstra<sup>e</sup>, Amy L. Ryan<sup>a,g,2</sup>, Anne M. van der Does<sup>e,\*</sup>

<sup>a</sup> Hastings Center for Pulmonary Research, Division of Pulmonary, Critical Care and Sleep Medicine, Department of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, CA, USA

<sup>b</sup> Emulate Inc., Boston, MA, USA

<sup>c</sup> Helmholtz Pioneer Campus and Institute for Biological and Medical Imaging, Helmholtz Zentrum München (GmbH), Neuherberg, Germany

<sup>d</sup> Chair of Biological Imaging at the Central Institute for Translational Cancer Research (TranslaTUM), School of Medicine, Technical University of Munich, Munich, Germany

<sup>e</sup> PulmoScience Lab, Department of Pulmonology, Leiden University Medical Center, Leiden, the Netherlands

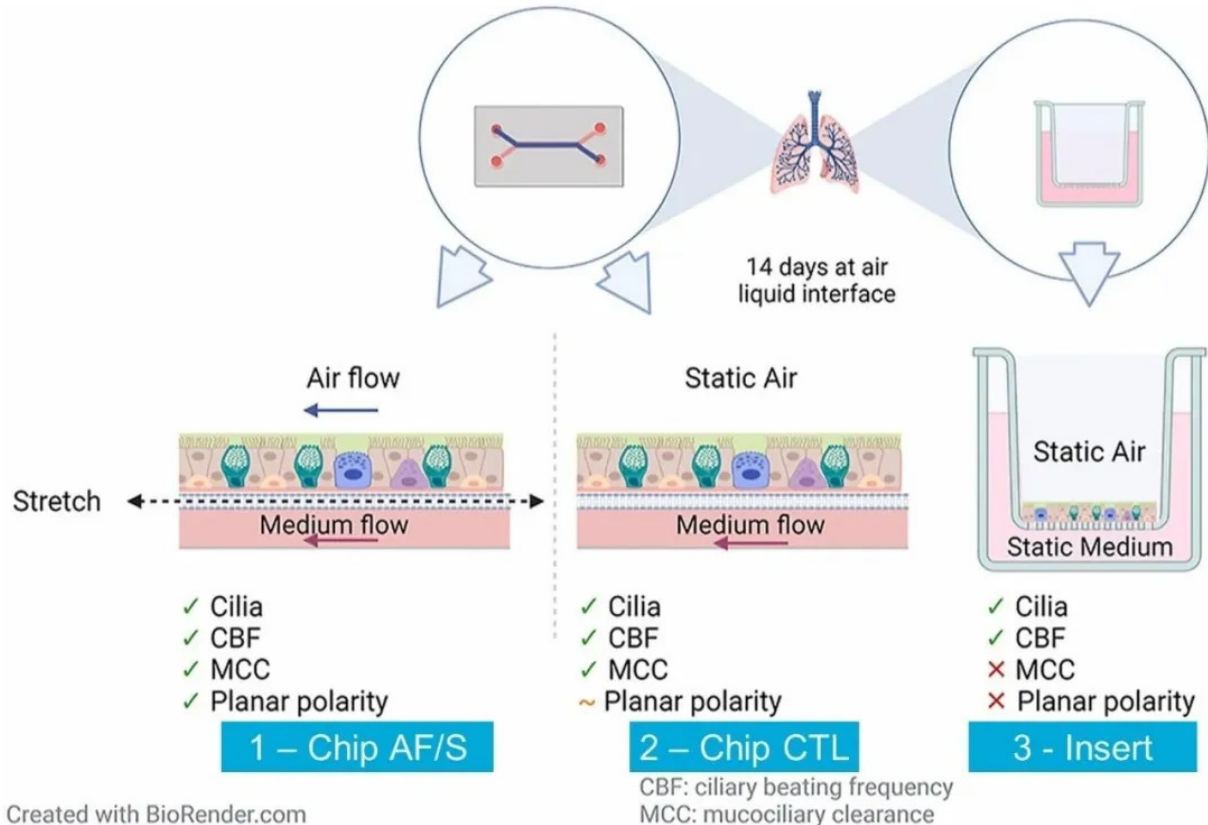
<sup>f</sup> Department of Infectious Diseases, Leiden University Medical Center, Leiden, the Netherlands

<sup>g</sup> Department of Stem Cells and Regenerative Medicine, University of Southern California, Los Angeles, CA, USA

## 背景簡介

呼吸道粘膜表面通過粘液纖毛清除不斷清除吸入空氣中的污染物，這是防止肺部感染和損傷的重要防禦機制。這一功能依賴於特化上皮細胞的組合，這些細胞利用運動的纖毛將分泌的粘液和滯留在空氣中的物質運出氣道。靜態培養條件無法通過實驗控制上皮向不同氣道分支特有的細胞組成分化。這限制了人氣道上皮細胞模型的研究轉化價值，尤其是在研究感染性病原體如何破壞成熟的黏膜纖毛清除，以及為什麼某些疾病會主要影響大氣道或小氣道的機制探索。

與呼吸有關的機械應力，包括拉伸應力和剪切應力，在體內肺上皮組織的整個發育過程中都會產生重要作用，在大氣道和小氣道中的作用程度不同，並能在體外改善氣道上皮屏障功能。為了探索正常呼吸相關氣流剪切力和應變可調節人原發性支氣管上皮細胞（hPBEC）的粘膜功能和發育機制，本文採用了三種不同的實驗模型：利用Emulate氣道器官晶片構建含有可拉伸多孔膜和氣液介面（ALI）的分化hPBEC的方案，可以模擬拉伸作用力和氣流剪切力（1-Chip AF/S）；缺乏拉伸和氣流剪切力，但納入培養基液流的初代氣道模型（2-Chip CTL）；傳統的插入式細胞培養模型則是完全靜態的（3-Insert）。利用不同模型，本文評估了粘液纖毛清除功能和氣道上皮在動態微流控環境下的分化情況。



## 機械力促使組織分化

利用Emulate Chip-S1器官晶片，活化後的中間膜層包被IV型膠原ECM蛋白，然後接種hPBEC後，可在頂部通道形成細胞粘附和匯合單層。初期培養基浸沒培養階段，頂部和底部通道對hPBEC進行動態培養基灌注；然後在頂部通道切換到氣液介面 (ALI) 以啟動分化，同時在底部通道繼續進行培養基灌注 (圖 1A 底部)。

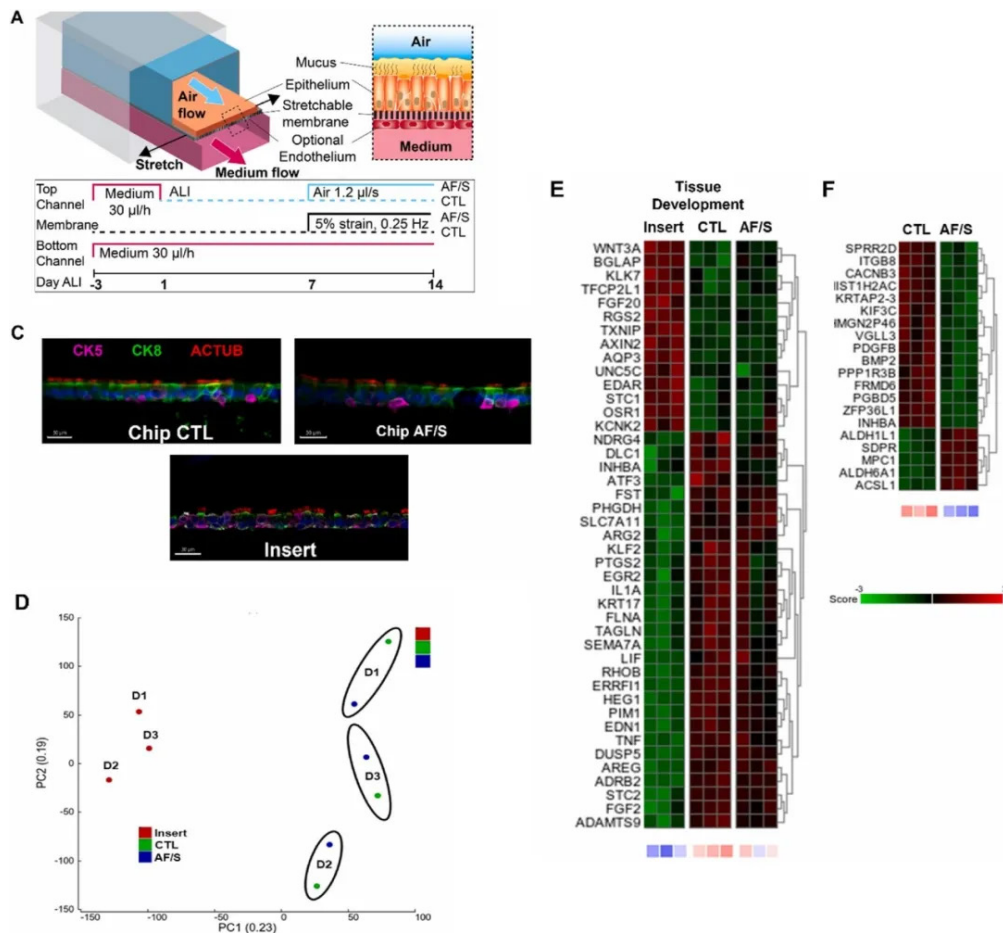


圖 1. 器官晶片機械力改變氣道上皮細胞的組成

Emulate器官晶片

評估氣道上皮發育的標誌物發現：器官晶片和插入式靜態細胞培養模型均表現出典型的假複層，基底細胞靠近膜，管腔細胞有明顯的褶皺 (圖1C)。Chip AF/S晶片的膜以 0.25 Hz 的速率垂直於通道線性驅動，以在晶片中心實現最大5%的迴圈拉伸，這與靜息呼吸時小氣道的預測生理情況相吻合。AF/S晶片中的氣流設定為在細胞上產生約 0.1 mPa的氣流剪應力，這與小氣道呼吸條件相當。

為了比較各種培養條件對hPBECs組織結構和粘液纖毛清除MCC功能的影響，文章對三個不同供體的靜態培養 (Insert) 和動態器官晶片 (Chip CTL 和 Chip AF/S) 進行了RNAseq分析，主成分分析PCA結果顯示，靜態Insert組和動態器官晶片的轉錄組存在明顯差異 (圖1D)，其中組織發育相關的通路在這兩個組別中差異顯著 (圖1E)。而且，與CTL對照組晶片相比，氣流和拉伸組AF/S組晶片的TGF- $\beta$ /BMP 信號轉導相關的基因 (BMP2、INHBA和PDGFB) 的表達量呈現減少趨勢 (圖 1F)。



## 機械力促使粘液纖毛清除功能形成

成熟氣道上皮的一個核心功能標記：是粘液纖毛清除（MCC）。文章通過跟蹤螢光微珠在纖毛上皮細胞中的位移來直接評估MCC的功能。儘管跳動頻率相似，但器官晶片中的MCC明顯優於靜態插入式培養。器官晶片中，MCC的總表面積比例明顯更高，從而使組織平均MCC速度提高了一倍（圖2C-E）。這些表明，在器官晶片上培養hPBEC並結合氣流和拉伸可提供關鍵的環境線索，促進體外多纖毛氣道上皮細胞的功能成熟。

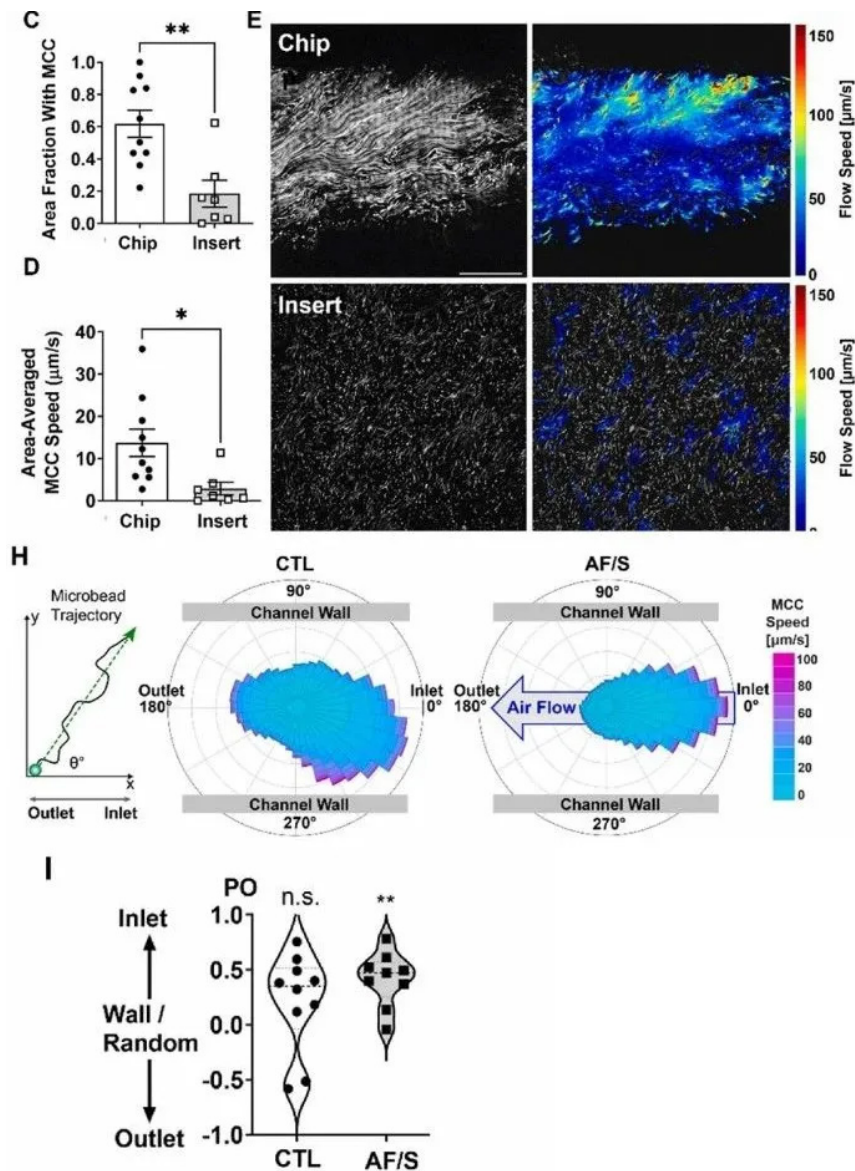


圖 2. 氣流和拉伸的機械力可加速hPBEC的粘液纖毛清除

在兩組器官晶片中，MCC都傾向於沿著通道的長度排列，並指向晶片的兩端。而且對照組CTL晶片中的MCC只微弱地偏向入口，而氣流和拉伸組AF/S組晶片中的MCC則普遍偏向入口，即與所施加的空氣和培養基灌流方向相反，這一點可以從每種條件下螢光微珠軌跡的角度長條圖中看出（圖2H）。用極序參數PO量化MCC向晶片入口或出口的極化後，文章定量證實了氣流和拉伸組AF/S晶片中的MCC是單向流向入口的，而對照組CTL晶片中的MCC則不是（圖2I）。這表明，生理水準的氣流和拉伸會對氣道上皮纖毛成熟產生重要影響。

## 機械力促使多纖毛細胞成熟基因表達

為了探究器官晶片的機械力對細胞培養的MCC加速成熟和極化背後的機制，文章對RNAseq資料中與纖毛功能相關的基因進行了檢查。與靜態插入式培養相比，器官晶片顯示該類基因組的表達水準有所提高（圖3A）。而供體增加後的後續qPCR分析並沒有確證動力蛋白相關的基因DNAH11 和 RSPH4a 的顯著變化（圖3B）。而平面細胞極性PCP基因的表達表明：在多纖毛細胞成熟過程中起重要作用的VANGL1的基因表達，在對照組器官晶片中比靜態培養顯著增加了（圖3C）。蛋白水準上的VANGL1，器官晶片條件下，VANGL1的定位都是不對稱的，沿著纖毛細胞的邊界呈新月形；而靜態插入培養中，VANGL1的表達是彌散的，只有少數新月形（圖3D 和 E）。細胞邊界上不對稱的新月形PCP定位是氣道上皮纖毛搏動功能成熟的一個關鍵指標。這些結果共同證明，晶片上 MCC 功能的增強可能是多纖毛細胞加速成熟的結果。

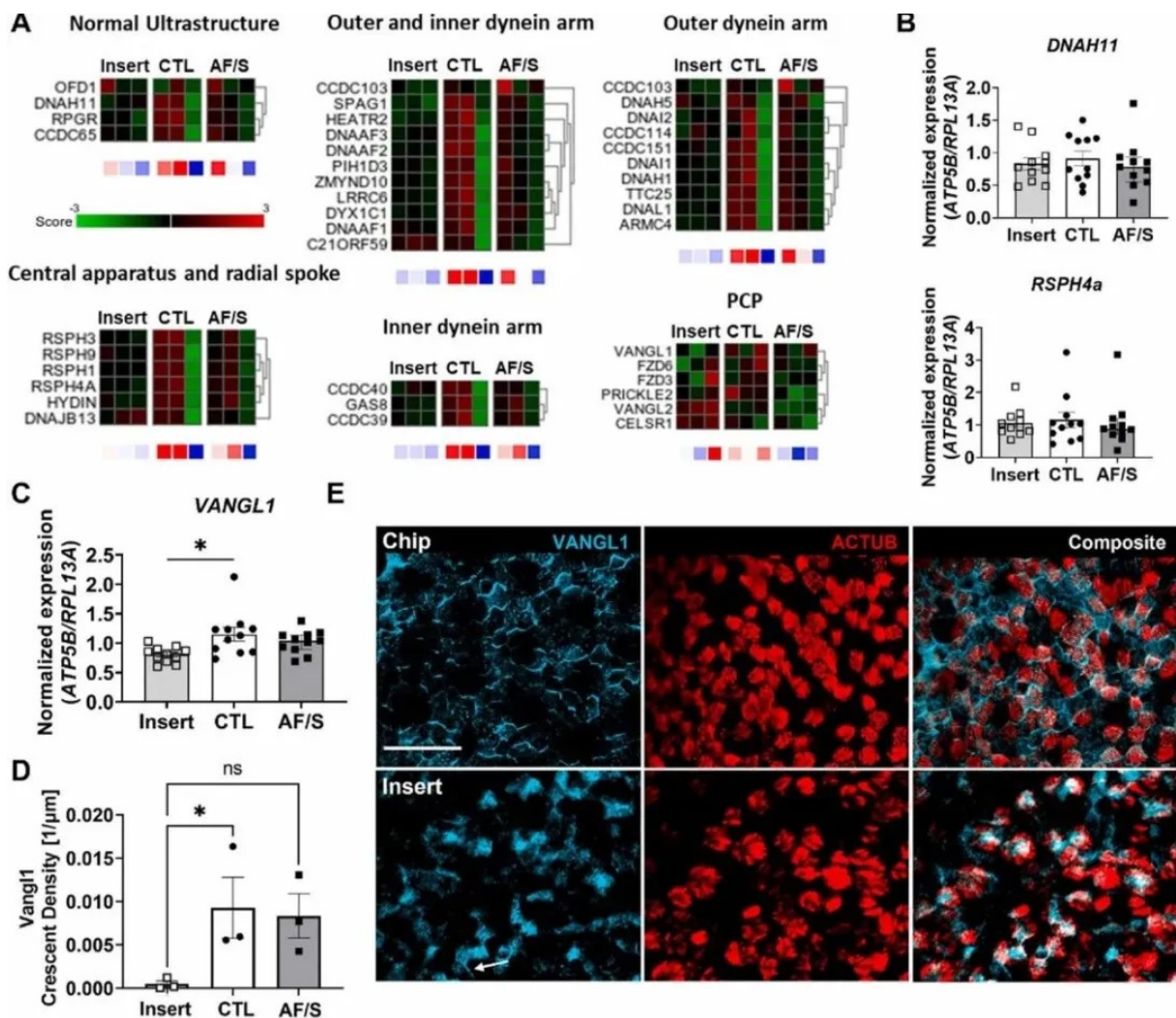


圖 3. 氣流和拉伸的機械力促使多纖毛細胞成熟相關的 VANGL1 表達

## 機械力影響基底細胞分化

為了研究粘液纖毛清除率的增加是否伴隨著上皮細胞類型數量的變化，我們通過細胞類型標記基因的基因表達和免疫組化來評估細胞組成。相比靜態插入培養，對照組CTL器官晶片中細胞培養物的基底細胞標記基因 (TP63和KRT5) 和角蛋白 8 (KRT8) 的基因表達水準明顯更高 (圖4A)。KRT8是一種標記基因，用於指示非基底細胞、管腔細胞、超基底早期祖細胞或基底管腔前體細胞。分化的管腔細胞標誌物分泌幹細胞SCGB1A1、杯狀細胞 (MUC5AC) 和纖毛細胞 (FOXJ1) 的表達與靜態培養沒有差異。細胞類型特異性蛋白的 IF 染色表明，器官晶片中分化的管腔細胞水準與靜態培養相似 (圖4B)。

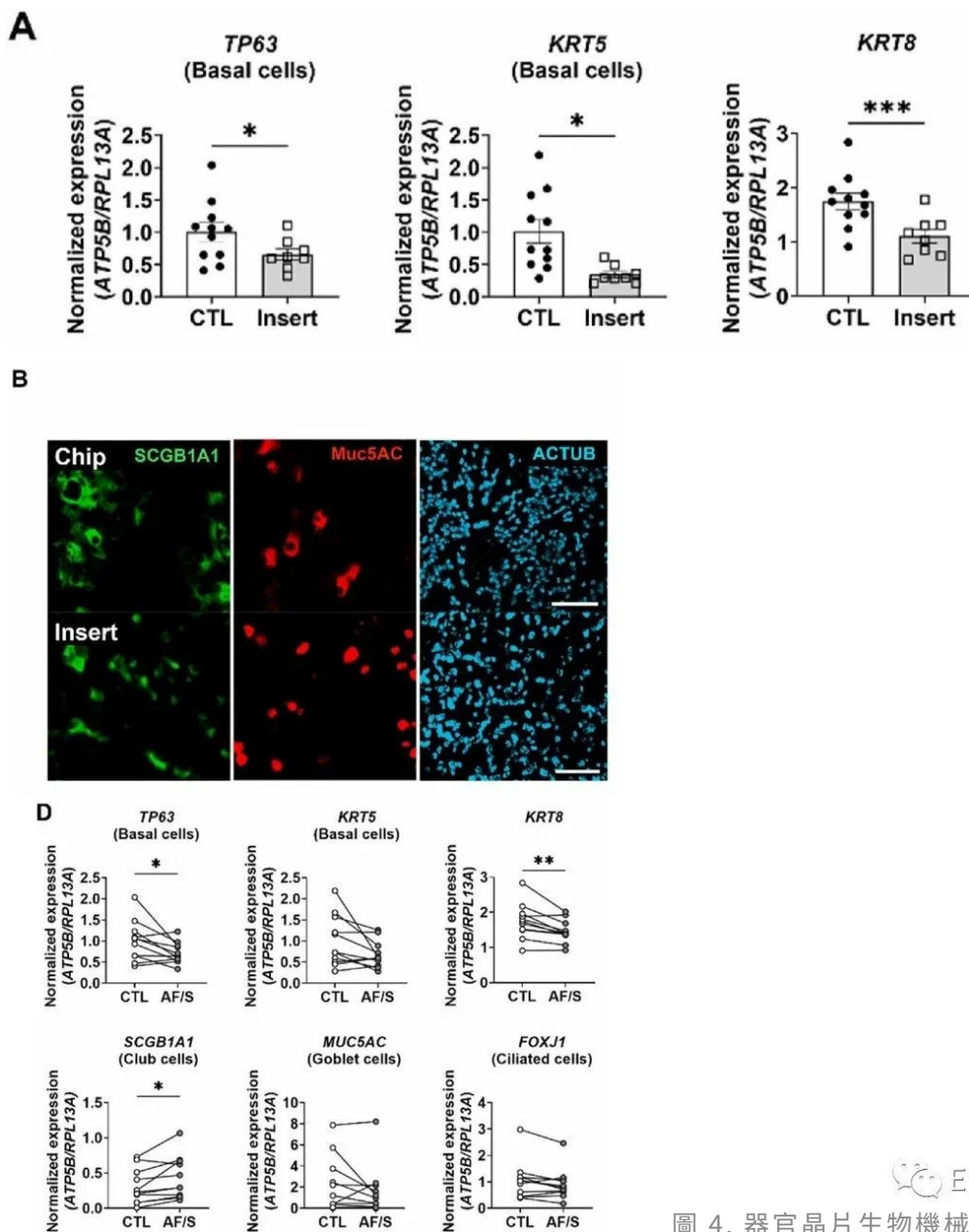


圖 4. 器官晶片生物機械力對上皮細胞分化的影響

與對照組CTL晶片相比，AF/S晶片表達的基底細胞遺傳標記 (TP63、KRT5) 和KRT8+細胞的水準明顯較低。而俱樂部細胞標記物SCGB1A1的表達則明顯增加 (圖4D)。這些結果表明，與靜態培養相比，器官晶片的管腔上皮細胞組成沒有發生顯著變化，但生物機械力會影響基底細胞分化狀態。



## 機械力降低炎症和ECM相關基因表達

氣流和迴圈拉升機械力作用使得典型的炎症趨化因數IL-8的基線水準在器官晶片中顯著降低（圖5A）。促炎標記物PTGS2 (COX-2) 的表達也明顯降低（圖5B），通過多重檢測法評估的幾種細胞因數（G-CSF、IL-9 和 MIP-1 $\beta$ ）的蛋白水準也是如此，這證實了存在氣流和拉伸的器官晶片產生的炎症因數的總體水準較低（圖 S5A）。

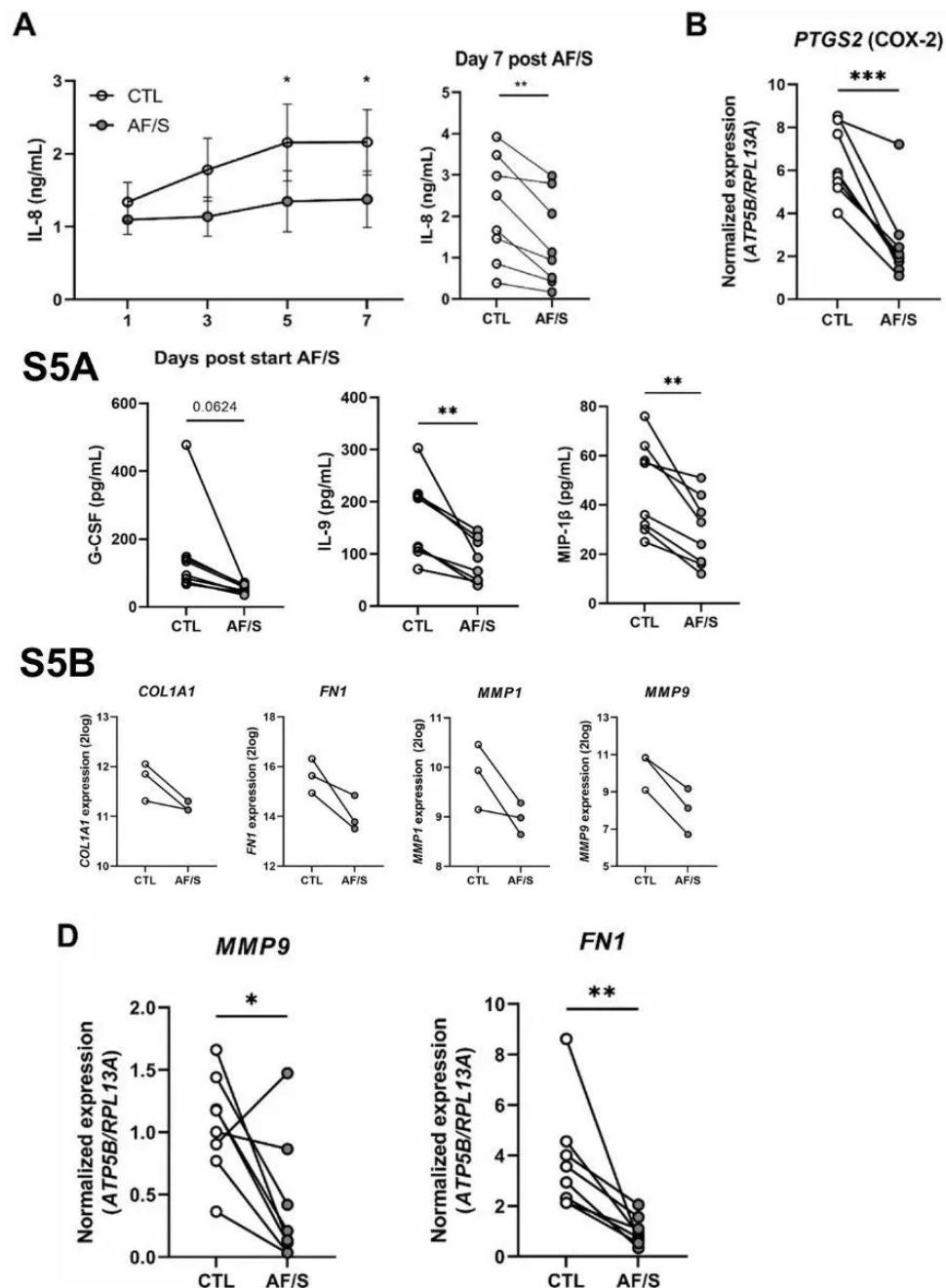


圖 5. 氣流和拉伸機械力可減少炎症狀態和 ECM 相關基因的表達

為了探索對ECM生成的影響，與對照組CTL晶片相比，包括MMP1、MMP9、COL1A1和 FN1在內的特定成分在氣流和拉伸組AF/S晶片中的表達下調（S5B）。對N=8個供體的 MMP9 和 FN1 進行的 qPCR 分析表明，與 CTL 晶片相比，AF/S 晶片中的這兩個基因顯著下調（圖5D）。這些結果共同表明，生理相關的機械力可能會影響氣道上皮組織的炎症信號轉導和 ECM 重塑。

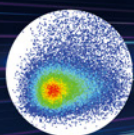
本文利用Emulate器官晶片構建原代人類氣道上皮細胞在不同生物機械力環境下的模型。證實了與靜態培養相比，器官晶片提供的生物機械力能使細胞表現出明顯更強的粘液纖毛清除能力，促進多纖毛細胞成熟基因表達、並影響基底細胞分化，還能降低炎症和ECM相關基因表達。這些發現可能為支氣管擴張症等呼吸道疾病的病理機制的揭示提供依據；並且為研究生物機械應力作用下的纖毛生成和上皮再生開闢了新的途徑。

## 關於 Emulate

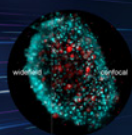
器官晶片的開創性工作是由哈佛大學 WYSS 研究所的系主任 Donald E. Ingber 院士團隊完成的，其在Science發表了器官晶片領域具有里程碑意義的第一個成功的模型：肺晶片。之後，Donald E. Ingber 院士作為共同創始人，成立了 Emulate 公司，將器官晶片技術商業化運行，與更廣泛的生命科學界同仁分享這一精妙的器官晶片技術。自成立以來，我們致力於開發高度類比人體生理特徵的器官晶片技術和不同類型的創新應用，以全面瞭解疾病發生規律和幫助評估藥物的真實反應，改善人類健康。目前，Emulate 提供經過驗證的肝、腎、十二指腸、結腸、肺、腦等器官晶片解決方案的同時支援客戶定制化的研究需求，是全球市場佔有率領先的器官晶片品牌。全球系統裝機量超過 400 台，已經被全球排名前 20 的藥企全部合作引入，採用 Emulate 人體模擬系統發表的文章數已超過 100 篇，在同類產品中大幅領先。Emulate 相信，人類生物學和器官晶片技術的結合能夠點燃人類健康的新時代。

# THE FUTURE LAB | FUTURE CMC

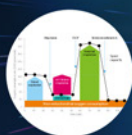
進階與您一同邁入新未來



Multi-color Flow



Confocal Live Image



Energy Metabolism



Bioreactor



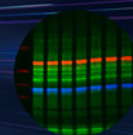
Organ Chip



Digital PCR



Multiplex Assay



IP Western

