

腫瘤血管新生測試之三維細胞球 共培養微流體晶片技術

A Microfluidic 3D Cell Spheroid Co-culture Technique for Tumor Angiogenesis Testing

羅明心、謝菲尼、許佳賢

Didem Rodoplu Solovchuk, Jefunnie Sierra Matahum, Chia-Hsien Hsu

體外模擬腫瘤血管新生模型可以用來研究腫瘤血管新生機制與進行抗腫瘤血管新生藥物測試。利用類胚狀體 (embryoid bodies, EBs) 和腫瘤細胞球 (tumor spheroids, TSs) 的共培養可以在體外模擬腫瘤血管生成。在這裡我們介紹一種基於微流體懸吊滴技術的三維細胞球體共培養裝置 (microfluidic hanging drop-based spheroid co-culture device, μ -CCD)，可以透過簡單的手動操作程序和設定來產生和共培養類胚狀體和腫瘤細胞球。這項技術可以在一個微流體晶片上相鄰的八對懸吊液滴內形式生成大小均勻的類胚狀體和腫瘤細胞球，然後再透過合併液滴來配對培養類胚狀體和腫瘤細胞球使得球體以研究腫瘤誘導血管生成萌芽。我們透過最佳化裝置的物理參數讓懸吊液滴可保持長達十天的穩定性。我們利用小鼠 ES-D3 胚胎幹細胞株、MDA-MB-231 和 MCF-7 乳癌細胞株來生成類胚狀體、侵入性腫瘤細胞球和非侵入性腫瘤細胞球。細胞培養之實驗結果透過共聚焦成像結果顯示，在此共培養模型中，與腫瘤血管生成相關的血管百分比面積和總血管長度在共培養 6 天後都有增加。我們並且利用此模型來進行抗腫瘤血管新生藥物測試。上述結果顯示，此裝置提供了一種簡單且高效的細胞球體生成和共培養方法，可用於共培養類胚狀體和腫瘤細胞球來作為抗腫瘤血管生成藥物測試，和具有用於其他需要三維細胞球體共培養應用之潛力。

In-vitro tumor angiogenesis models can be used for studying the mechanisms of tumor angiogenesis and testing anti-tumor-angiogenesis drugs. Co-culturing of embryoid bodies (EBs) and tumor spheroids (TSs) allow mimicking tumor angiogenesis in-vitro. Here, we report a microfluidic hanging drop-based spheroid co-culture device (μ -CCD) that permits the generation and co-culturing of EBs and TSs using a simple manual operation procedure and setup. In brief, uniform-sized EBs and TSs can be generated on the device in eight pairs of hanging droplets from adjacent microfluidic channels, followed by the confrontation of EB and TS pairs by merging the droplet pairs to culture the EB-TS spheroids to investigate tumor induced angiogenic sprouting. The physical parameters of the device were optimized to maintain the long-term stability of hanging droplets for up to ten days. Mouse embryonic stem cell line ES-D3, and breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 cells were used to generate EBs, invasive TSs, and non-invasive TSs respectively. The confocal imaging results showed that the vessel percentage area and total vessel

length which are linked to tumor-angiogenesis, all increased after 6-days of co-culturing. An anti-angiogenesis drug testing on the co-cultured EB-TS spheroids was also demonstrated in the device. The above results show that the μ -CCD can provide a simple yet high-efficiency method to generate and co-culture cell spheroids may also be useful for other applications involving spheroid co-culturing.

一、前言

腫瘤血管新生是造成腫瘤生長與癌症轉移的主要原因之一，利用可模擬體內腫瘤微環境的體外細胞培養模型進行腫瘤血管生成實驗和抗血管新生藥物測試，可以加速相關治療之發展⁽¹⁾。近年來已有一些微流體晶片被發展來用於培養三維腫瘤細胞球體體外模型，用以了解生長因子、血管生成促進和抑制等分子如何影響腫瘤血管新生。這些包括可以生成纖維細胞相關的腫瘤微環境，以用於探測各種基質細胞在血管網絡狀腫瘤中的作用，和進行血管生成的信號通路分析的微流體晶片平台⁽²⁾，可共培養人臍靜脈內皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 和腫瘤細胞球體的微流體體外腫瘤微環境模型⁽³⁾，以及結合 U 形底 96 孔板盤和微流道的裝置，可用於共培養三維腫瘤細胞球體和人臍靜脈內皮細胞以研究腫瘤誘導血管新生⁽⁴⁾。上述體外模型是使用三維腫瘤細胞球體與其他非細胞球體的細胞共培養來進行共培養以模擬腫瘤血管新生之微環境，為了更進一步增加體外微流體晶片模型之仿生性，我們發展了第一個三維細胞球體共培養裝置，該裝置可以精確控制實驗條件來生成兩種三維細胞球體和進行共培養，透過共培養類胚狀體和腫瘤細胞球體這兩種不同細胞類型來誘導血管在腫瘤球體中新生，以作為腫瘤血管新生研究與藥物測試。此裝置之設計是在裝置上層含有有兩個相鄰的微流道，每一組通道可以再一次操作下產生八個懸吊液珠，每個懸吊液珠內可以生成一個三維細胞球體。此兩組微流道可以分別用來生成類胚狀體 (EB) 和腫瘤細胞球體這兩種不同的三維細胞球體。在裝置的下層則含有另一個微流道，用於將上層不同流道內的懸吊液滴合併形成一個懸吊液珠，讓原本液滴中的類胚胎體與和腫瘤細胞球體可以有物理性的接觸。此過程只需要簡單的手動操作，並且可在 15 秒內完成。我們使用小鼠胚胎幹細胞和人類 MDA-MB-231 和 MCF-7 乳腺癌細胞來進行球體生成實驗以展示此晶片技術之功能。

二、實驗所使用之材料與方法

1. 微流晶片設計與製作

此微流體裝置是使用 SOLIDWORKS 軟體進行設計的。接著再利用電腦數控 (computer numerical control, CNC) 銑削機器 (Modela MDX-40 3-D, Roland DG Corporation, 日本) 切割 1.2 mm、2.0 mm 和 1.5 mm 厚度的聚苯乙烯 (polystyrene, PS) 片材料，以形成具有結構之聚苯乙烯。接著再將這些加工的聚苯乙烯片利用使用雷射切割機 (Flux Inc., 臺灣) 切割的雙面膠帶進行黏合，以完成微流體片裝置。此機械加工方式製作聚甲基丙烯酸甲酯 (polymethyl methacrylate, PMMA) 裝置支架。聚二甲基矽氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 裝置則是透過 PDMS 基質材料與交聯劑的混合 (比例為 10 : 1，形成之材料其楊氏係數約為 580 kPa⁽⁵⁾) 和透過使用 SU-8 基板模來製備。

2. 接觸角量測

氧離子和 Pluronic 處理過的 PS 材料表面靜態水接觸角測量，以及對 μ -CCD 裝置上懸吊液滴進行側面圖片拍照，是以光學方式進行。為了評估材料表面親水性，我們將 10 μ l 去離子 (deionized, DI) 水滴到表面上，然後使用解剖顯微鏡 (Nikon SMZ 1500, Nikon Inc., 日本) 拍攝影像。每次測量使用三個樣品，所有測量均一式三份進行。對於懸掛液滴測量，記錄了來自兩個不同設備的八個液滴。最後，我們使用 Image-J 軟體和低鍵軸對稱液滴形狀分析插件 (Stalder, 2005) 來計算每個 μ -CCD 液滴的接觸角。

3. 細胞培養

細胞培養皿中培養小鼠胚胎幹細胞 (mouse embryonic stem cell, mESC (ES-D3 細胞, CRC, 臺灣))、人類 MDA-MB-231 和 MCF-7 乳腺癌細胞 (臺灣生物資源收集和研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC, Taiwan))。mESC 是在含有 15% (v/v) 胎牛血清 (FBS) (SH30070, Thermo HyClone, MA, USA)、1% (v/v) 非必需胺基酸 (Gibco Invitrogen Co., MA, USA)、1% (v/v) L-麩醯胺酸 (Gibco Invitrogen)、0.1 mM 2-巰基乙醇 (Gibco Invitrogen)、和 2,000 U/ml ESGRO (ESG1107, Minipore, 美國) 的 DMEM 培養基中於小鼠胚胎纖維細胞飼養層上在 37 °C、5% CO₂ 的加濕培養箱中的培養基中培養。人類 MDA-MB-231 和 MCF-7 細胞在含有 10% (v/v) FBS (Millipore)、5% CO₂ 的 DMEM 培養基中於 37 °C 培養。當細胞系達到 80% 密集度時進行細胞繼代。我們使用膠原蛋白酶 IV (Gibco Invitrogen) 從將培養的 ES 細胞自其附著的小鼠胚胎纖維母細胞表面分離，然後再使用 TrypLE (Gibco Invitrogen) 將 ES 細胞解離成單細胞製成細胞懸浮液來注入晶片。在所有實驗之前，每個 μ -CCD 裝置均以 PluronicTM F-127 處理 24 小時，然後進行紫外線照射，之後將晶片置於 37 °C 環境下保存以保持其表面親水性。MDA-MB-231 和 MCF-7 細胞是使用 0.2% 胰蛋白酶、0.05% EDTA (Gibco Invitrogen) 來進行細胞解離，最後製備成含有 0.05% 甲基纖維素的細胞懸浮液 (細胞密度為 3×10^5 cell/ml) 來注入微流體通道中。在晶片中培養時每兩天更換一次細胞培養液。

4. 活體螢光顯微照相

我們使用含有 10 μ M 的長期細胞追蹤染料 CMFDA (Molecular Probes, 美國) 的 DMEM 在晶片上對腫瘤細胞球進行 60 分鐘之染色，之後再用培養基清洗流道 3 次，已移除染劑。之後再使用 Nikon Eclipse Ti-2 倒立式螢光顯微鏡 (Nikon, Japan) 來觀察腫瘤細胞球。

5. 藥物測試

Sunitinib 是一項 FDA 核准的抗血管新生藥物，我們製備溶解在二甲基亞 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 中濃度為 5 μ M、10 μ M 和 50 μ M 的 Sunitinib 溶液，並且將其儲存在 -20 °C 冰箱中。在每次實驗之前，將所儲備之溶液解凍並添加到 DMEM 培養基中來準備最終濃度為 0.5 μ M、1 μ M 和 5 μ M 的含藥培養基。不論藥物濃度為何，所有含藥培養基中的 DMSO 濃度均為 0.01% (v/v)。所有的藥效測試實驗都是在細胞實驗第 4 天將含藥物的培養基注入 μ -CCD 裝置中，然後繼續共培養 6 天。之後在第 7 天和第 10 天收穫球體進行共聚焦成像來評估血管生成，以及利用西方點墨法分析 CD31 表現。

6. 共軛焦顯微鏡拍照之細胞樣本準備

為了評估 EB 和 EB@TS 球體中的血管生成結果，EB 和 EB@TS 球體在第 7 天和第 10 天會從 96 孔盤和 μ -CCD 裝置中收集出來並且進行免疫螢光染色。 μ -CCD 裝置中球體收集是透過將過量的 1×PBS 溶液注入晶片中史地液滴破裂滴入培養皿中。接下來使用移液器 (使用 1000 μ l 移液器吸頭) 小心收集球體，然後將其重新置備於 1×PBS 溶液放入 15 mL 管中離心後去除上清液。接下來使用含有 4% (w/v) 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 的 1×PBS 溶液浸泡球體 30 分鐘將其固定，之後再將其重新懸浮在 1×PBST (0.1% (v/v) Tween20) 溶液中以及離心 3 次，以去除 PFA。我們使用 0.5% (v/v) Triton X-100 (在 1XPBS 中) 進行細胞膜通透化，並且在之後使用 PBST 溶液沖洗細胞 3 次以去除離心管中的界面活性劑。為了防止非特異性結合，我們將球體重新懸浮於含 5% (w/v) BSA 的 PBS 溶液中，並將其隔夜置放在 4 °C 冰箱。CD31 單株抗體 (ab222783, Abcam, 美國) 是置備在含 0.05% (v/v) Triton X100 和 5% BSA 之 PBS 溶液中，然後與球體在 4 °C 進行隔夜的作用。之後將此含抗體之溶液以 1×PBST 置換，在搖床上以 40 rpm 的速度洗滌 30 分鐘以從培養基中移除 Ab。細胞球體接著與含有稀釋至 1:200 (v/v) 比例二抗 Alexa Fluor® 647 (ab150075, Abcam, USA)，和稀釋至 1:500 (v/v) 比例藍色螢光核特異性染料 Hoechst 之溶液，在搖床上以 40 rpm 的速度在室溫環境反應 5 小時。在染色後以 1×PBST 溶液洗滌細胞球體 3 次，最後將球體重懸於 1×PBS 溶液中在 4 °C 環境中用鋁箔紙覆蓋保存。在共軛焦顯微鏡拍照之前我們使用移液管收集球體並放置在含有 35 毫米厚度玻璃底的細胞培養皿上 (α -plus, 臺灣)，將細胞球以 2 μ l 榮度的 Fluoromont™ 固定液 (Sigma, 德國) 覆蓋後置於細胞操作台內過夜乾燥。

7. 共軛焦顯微鏡照相與影像分析

我們使用帶有 SP5-II 模組的 Leica 共軛焦掃描儀進行共軛焦成像。鏡頭採用 20X 乾物鏡 (HC PL APO20X/0.70 PH2) 和 40X 油鏡 (HCX PL APO 40X/1.25 PH3) 進行影像擷取。在螢光探針之選用與激發光源方面，我們使用 1 mW HeNe 492 nm 波段雷射光激發 5-氟甲基螢光素二乙酸酯 (CMFDA) 螢光探針，使用氬雷射產生的 405 nm 波長光進行激發發射藍色螢光之 Hoechst 螢光探針，以及使用 10 mW HeNe 雷射的 650 nm 波段光激發 Alexa Fluor® 647 螢光探針。顯微鏡之增益、強度和針孔設定分別為 536–743 V、24% 和 1.00 Au。為了定量評估生成微血管網絡面積和長度，我們使用計算分析軟體 AngioTool 來分析血管網絡面積、血管長度、連接處和空隙度。這項軟體使用高斯濾波器進行血管識別，並使用基於 Hessian 的增強濾波器進行微血管段落之分割⁽⁶⁾。

8. 統計分析

所有分析皆為至少 4 次獨立實驗所得之結果，並利用單因子變異數分析 (one-way ANOVA) 和雙向變異數分析 (Tukey) 檢定以用於配對比較。所使用之軟體為 Origin Pro (OriginLab, 美國)。數值則是以平均值 (mean) \pm 標準差 (standard deviation) 之方式呈現。分析結果具有統計學上之差異，是以 $p \leq 0.05$ 來判定。

三、實驗結果

1. 晶片之設計與操作

此晶片具有兩個相鄰之微流道，每個微流道的底部有八個開孔，與另一個微流道之八個開口併排。在這兩個流道的下層，含有一個微流道，可以透過加入液體讓其上方之兩組懸吊液滴自其開孔溢出而合併成一個新的液滴，讓原來分別處於兩個液滴中的細胞球沉降到新成的液滴中的底部形成兩個細胞的物理性接觸。如圖 1 所示，此微流控共培養裝置 (μ -CCD) 有兩層具有微流道結構和一層具有水庫結構的 PS 層相互組裝而成。如圖 1(a) 所示，每一個微流道有 8 個圓形孔可生成八個懸吊液珠，其下方之合併層 (將相鄰通道的液滴附著在一起) 則有 8 個對應的橢圓形孔。在各層的角落設有孔洞，來方便 PS 層組裝時能夠將各層對準。為了減少液體在培養過程當中的蒸發， μ -CCD 是放置在一個底部含有 10 ml 1xPBS 溶液的 100 mm 細胞培養皿 (Gene DireX™ Inc.，美國) 中。我們額外製作了一個 PMMA 裝置支架，將 μ -CCD 架高以防止液滴與培養皿底部 PBS 溶液碰觸。(圖 1(c))。此外為了我們也在支架兩側添加 PDMS 層 (12×18×3 mm) 來增加 μ -CCD 裝置和 PMMA 支架 (20×80×3 mm) 之間的摩擦力，以避免裝置在操作過程中滑動。

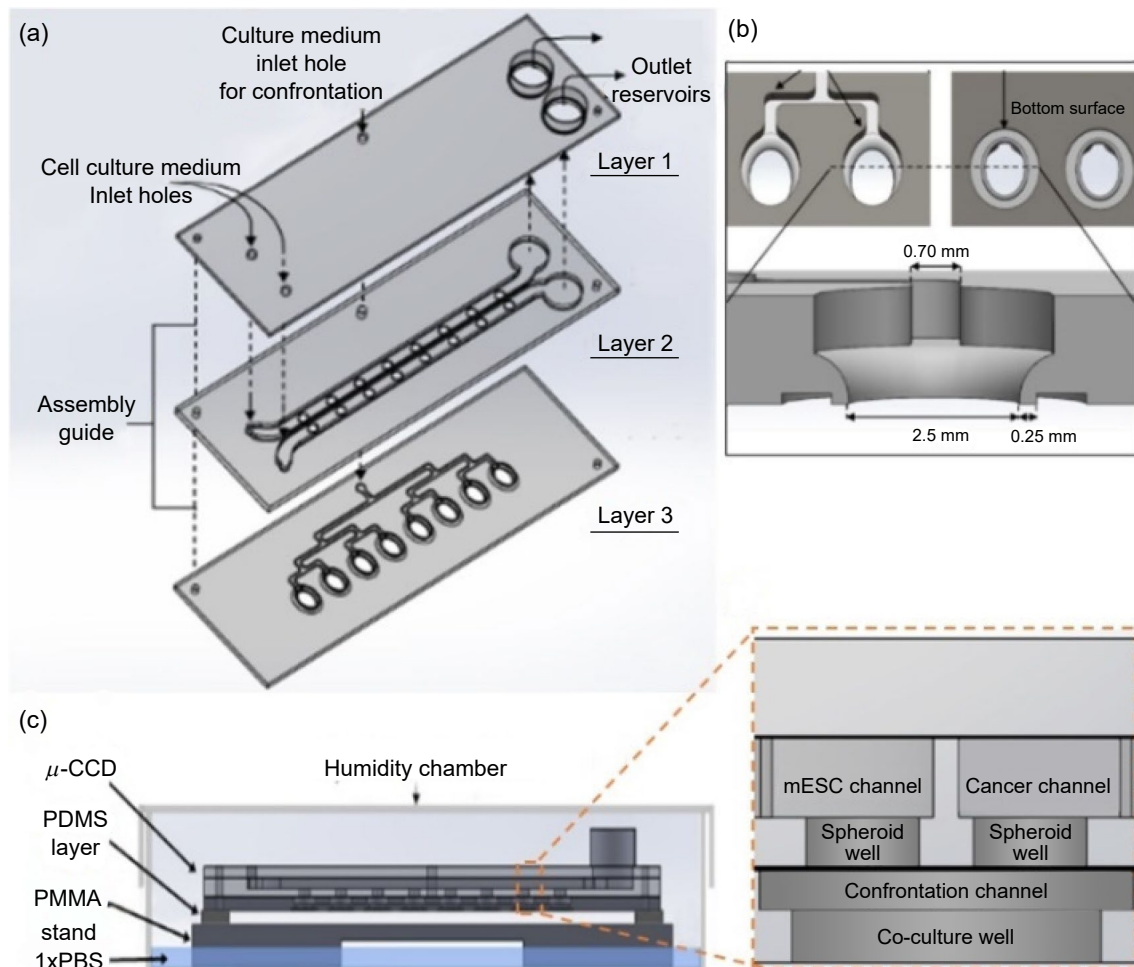


圖 1. μ -CCD 裝置之設計。(a) 三維爆炸圖 (b) 合併流道之上視圖與側視圖，(c) μ -CCD 裝置架設於保濕裝置內之側視圖，以及 (d) 其局部放大圖。

2. 裝置操作與細胞球體共培養

為了增加流道內部表面的親水性以易於培養液體在流道之操作，我們對流道內部表面施予電漿氧離子和 Pluronic 溶液之處理過後。結果顯示 PS 材料表面在其靜態水接觸角角度可以穩定的維持在 $20 \pm 3^\circ$ 達十天之久。裝置的操作步驟及實驗步驟之時間線的示意圖如圖 2 所示。首先將 2×10^4 細胞 / ml 濃度之 embryonic stem cell (ESC) 細胞懸浮液注入 μ -CCD 裝置的幹細胞培養流道 (圖 2(a)) 中。如圖 2(b) 所示，在注入後細胞懸浮液之後，將裝置靜置 15 分鐘可以讓細胞沉降至懸吊液滴底部聚集。之後利用培養液沖洗流道 3 次以除去為沉降於液滴中之多餘的細胞。在將 ESC 細胞於裝置中培養兩天之後 (此時 ESC 細胞已生成 EB)，將 3×10^5 細胞 / ml 濃度的癌細胞懸浮液注入裝置中的癌細胞培養流道，接著將癌細胞在裝置中培養兩天以形成腫瘤細胞球 (tumor spheroid, TS)。之後透過將新鮮培養液注入合併流道再將幹細胞培養流道和癌細胞培養流道的八組懸吊液珠合併，形成八對 EB 和 TS 細胞球體的物理系接觸以進行後續的 EB 與 TS 球體共培養。

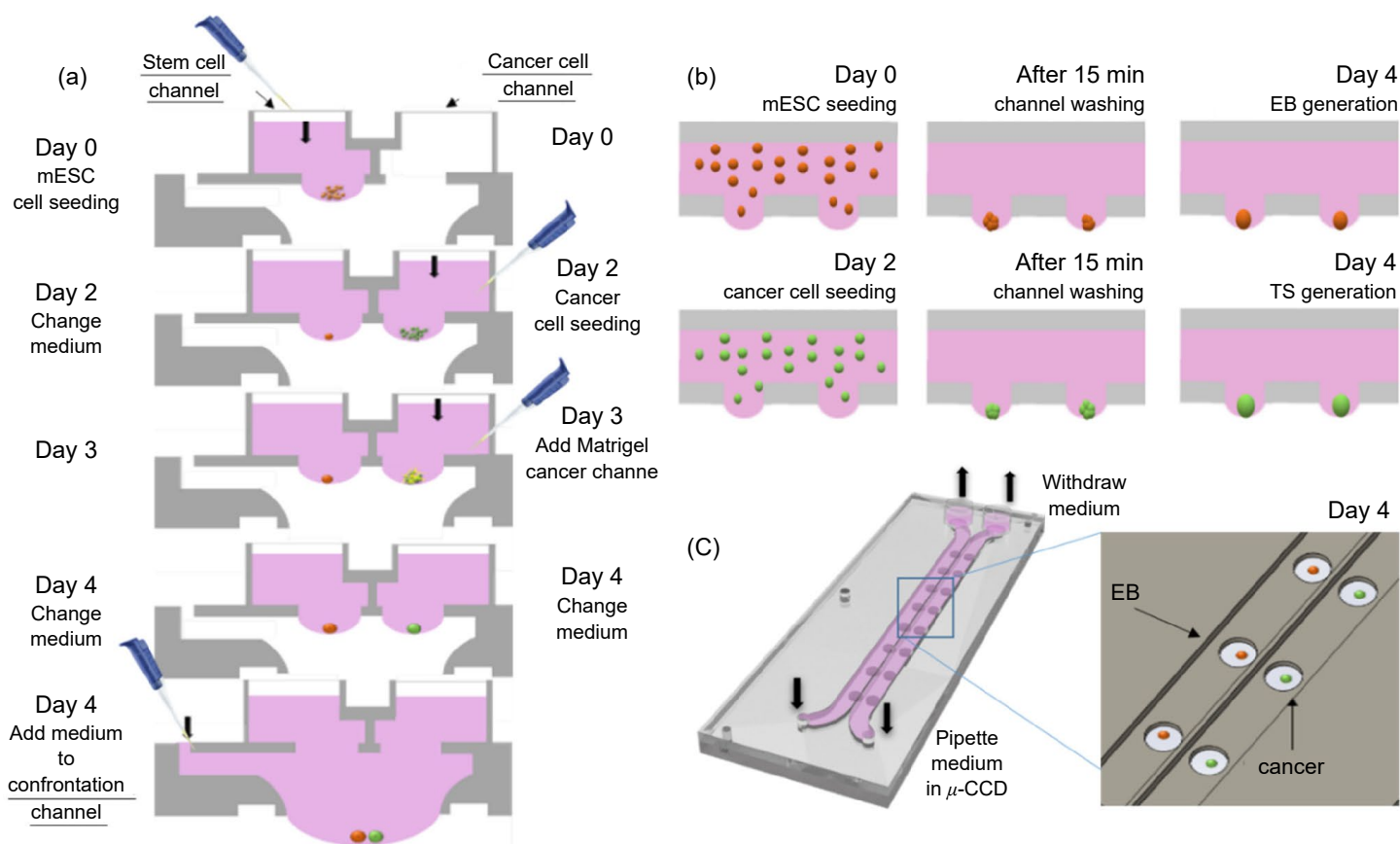


圖 2. μ -CCD 裝置操作步驟示意圖。(a) 短邊側視圖 (b) 長邊側視圖 (c) 裝置之三維示意圖。

要讓原本分別在不同流道的懸吊液滴中培養的 EB 與 TS 兩種細胞球形成物理性接觸和進一步共培養，我們將培養液注入合併流道來碰觸到其上層的兩個懸吊液滴，已在裝置底部形成一個較大尺寸懸掛液滴。之後 EB 與 TS 球體就會沉降至此新形成的懸掛液滴。我們透過用含有食用色素的蒸餾水注入合併流道來展示液滴合併和產生溪的一個液滴的過程與結果 (如圖 3 所示)。

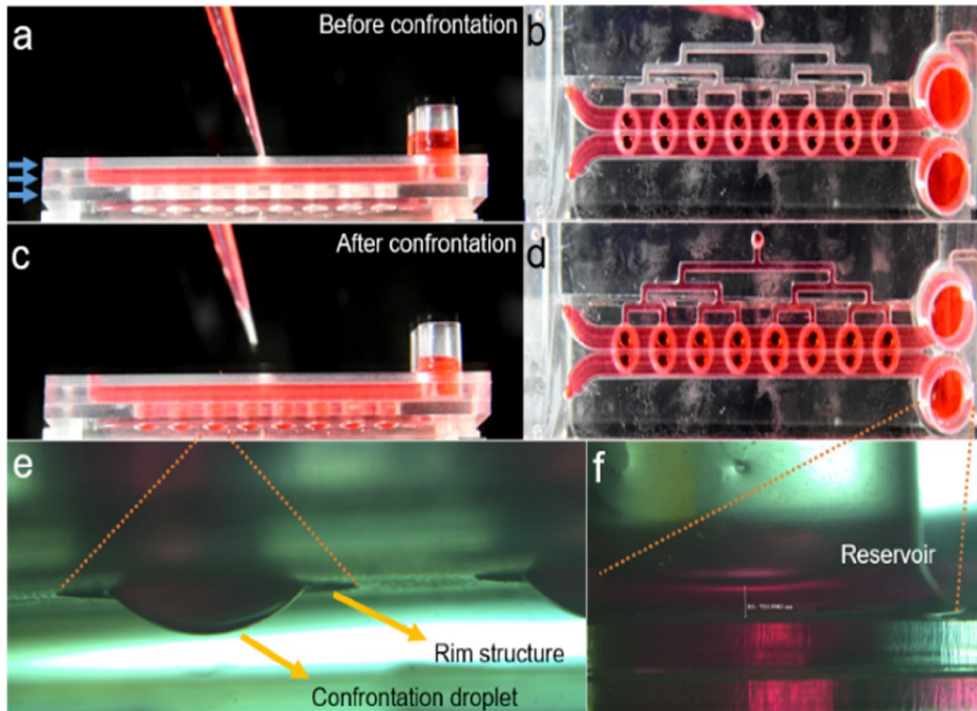


圖 3. 以注入紅色染料容液之裝置展現懸吊液滴合併之操作步驟與結果。(a)-(b) 懸吊液滴未合併以前之側視照片與俯視照片，(c)-(d) 懸吊液滴合併以後之側視照片與俯視照片，(e) 懸吊液滴合併所形成之液滴側視照片，以及 (f) 測視照片顯示合併後水庫內水位降低。

圖 4 為液滴合併前以及合併後的不同時間點所拍攝之細胞球，顯示細胞球在液珠合併後慢慢沉降並且滑向新形成液滴之中心位置且最終形成接觸，整個過程歷時約 15 秒。

3. 裝置內之細胞球體生成

在晶片上對於所培養之 EB 和 TS 瘤球體連續四天的觀察如圖 5(a) 所示。培養 EB 所使用的初始 ESC 細胞懸浮液濃度為 2×10^4 細胞 / ml，而培養 TS 所使用的細胞初始濃度為 3×10^5 細胞 / ml。當 ESC 以 2×10^4 細胞 / ml 濃度注入流道時，使用 ImageJ 軟體計算得知每個液滴內之初始細胞數目 191 ± 21 個 (圖 5(c))。癌細胞球培養是在 ESC 開始培養第 2 天後才開始，此時經過兩天培養的 ESC 細胞已生長成直徑 $160 \pm 13 \mu\text{m}$ 的 EB。我們在 EB 培養四天 (此時 TS 培養兩天) 後繼續進行 EB 和 TS 細胞球共培養。此時 EB、MCF-7 和 MDA-MB-231 細胞球體的直徑分別為 $272 \pm 26 \mu\text{m}$ 、 $440 \pm 20 \mu\text{m}$ 和 $285 \pm 23 \mu\text{m}$ 。從開始培養 ESC，MCF-7 癌細胞到後續的 EB 和 TS 共培養實驗結束的十天過當中，EB 和 MCF-7 球體的尺寸在此過程中不斷增加，最終直徑分別達到 $466 \pm 43 \mu\text{m}$ 和 $730 \pm 27 \mu\text{m}$ 。而在 ESC 與 MDA-MB-231 癌細胞共培養時，MDA-MB-231 球體直徑在第 7 天和第 10 天則分別為 $353 \pm 20 \mu\text{m}$ 和 $317 \pm 30 \mu\text{m}$ 。

4. 抗血管新生藥物測試

在將 EB 與 TS 共培養後可以看到腫瘤細胞球 TS 內的血管化 (如圖 6(a) 和 6(b) 所示)。在加入藥物的實驗組當中，雖然在第 7 天可以觀察到些微的血管網路生成 (圖 6(c))，但在

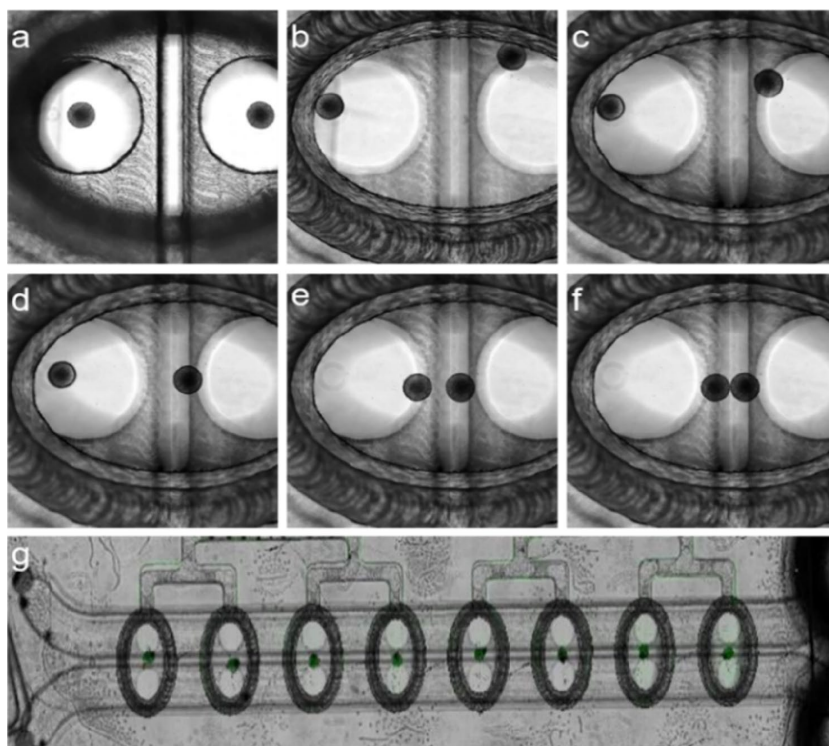


圖 4. 細胞球合併過程之顯微照片。(a) 液滴合併前，(b) 當注入 $200\ \mu\text{l}$ 的培養液於合併流道所形成的合併懸吊液滴弧度較小，兩個細胞球較難集中至液滴中心位置，(c)-(d)-(e)-(f) 當注入 $450\ \mu\text{l}$ 的培養液於合併流道所形成的合併懸吊液滴弧度較大，兩個細胞球可以在 15 秒的時間集中至液滴中心位置，(f) 形成物理性接觸之兩個細胞球，(g) 白光以及綠螢光合併照片顯示八對有物理性接觸的 EB 和 MCF-7 形成的 TS 細胞球 (照片中帶有綠色螢光的是 MCF-7 細胞)。

第 10 天可以觀察到血管網絡急劇減少 (圖 6(d))。此外，如圖 6(d) 和圖 6(e)-(i) 所示，在給予抗血管生成藥物 10 天之後，腫瘤球體逐漸呈破裂的型態。為了量化所生成之血管網絡，我們使用共軛焦顯微鏡拍攝對被 TRITC (紅色) 螢光染劑染色 CD31 的細胞球進行拍攝與定量分析。結果發現，腫瘤球當中之生成總血管長度和血管百分比面積在實驗地第 10 天有所增加，但在有施予藥物的實驗組當中，所生成之血管面積、血管總長度、血管百分比面積和血管分支指數在第 7 天和第 10 天有所下降 (圖 6(e)-(h))。

四、結論

三維細胞球共培養系統能模擬複雜的生理條件，對於建立體外疾病與生理模型至關重要。目前三維細胞球體之共培養需要在 96 孔盤或懸掛液滴中預培養球體，然後再手動收穫和轉移到另外的裝置，其過程不但耗時並且存在造成細胞傷害以及實驗再現性不佳的問題。

此論文所報導的懸吊液滴新型微流體三維細胞球共培養裝置 (μ -CCD)，可以透過簡易的操作步驟，來控制懸吊液滴以用於三維細胞球體之生成與操作。此研究結果顯示，利用 μ -CCD 方式進行實驗，可以形成大小均勻的細胞球體，並且避免使用傳統懸滴球體培養方

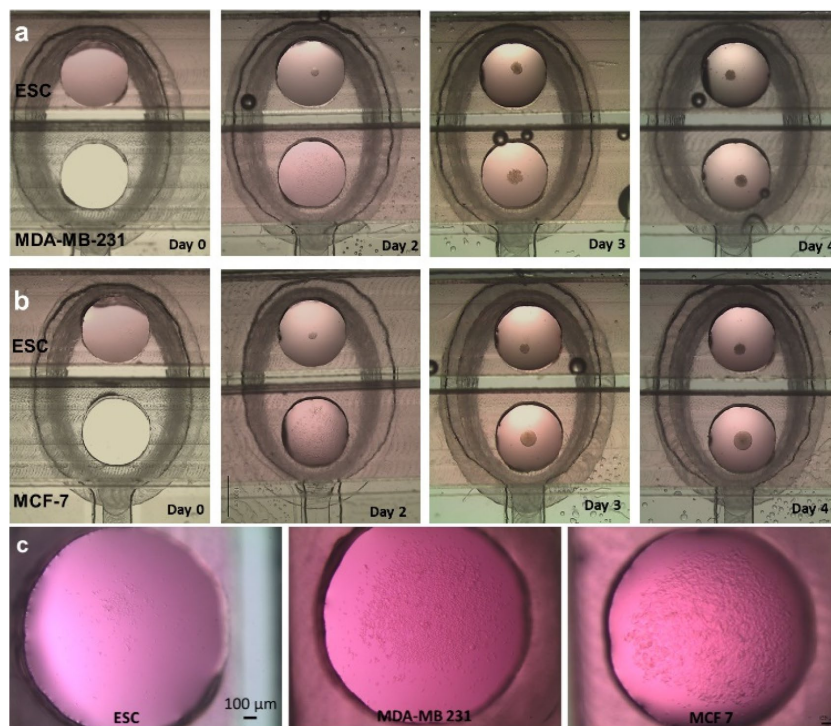


圖 5. 用 ESC、MCF-7 和 MDA-MB-231 細胞培養生成之三維細胞球體在不同時間點所拍攝之顯微照片: (a) ESC 形成之 EB 和 MDA-MB-231 細胞形成之 TS, (b) ESC 形成之 EB 和 MCF-7 細胞形成之 TS, (a)-(b) 照片中之比例尺 = 1000 μm 。 (c) 沉降在液滴底部但尚未形成三為球體前的 ESC, MDA-MB-231 和 MCF-7 細胞, 照片中之比例尺 = 100 μm 。

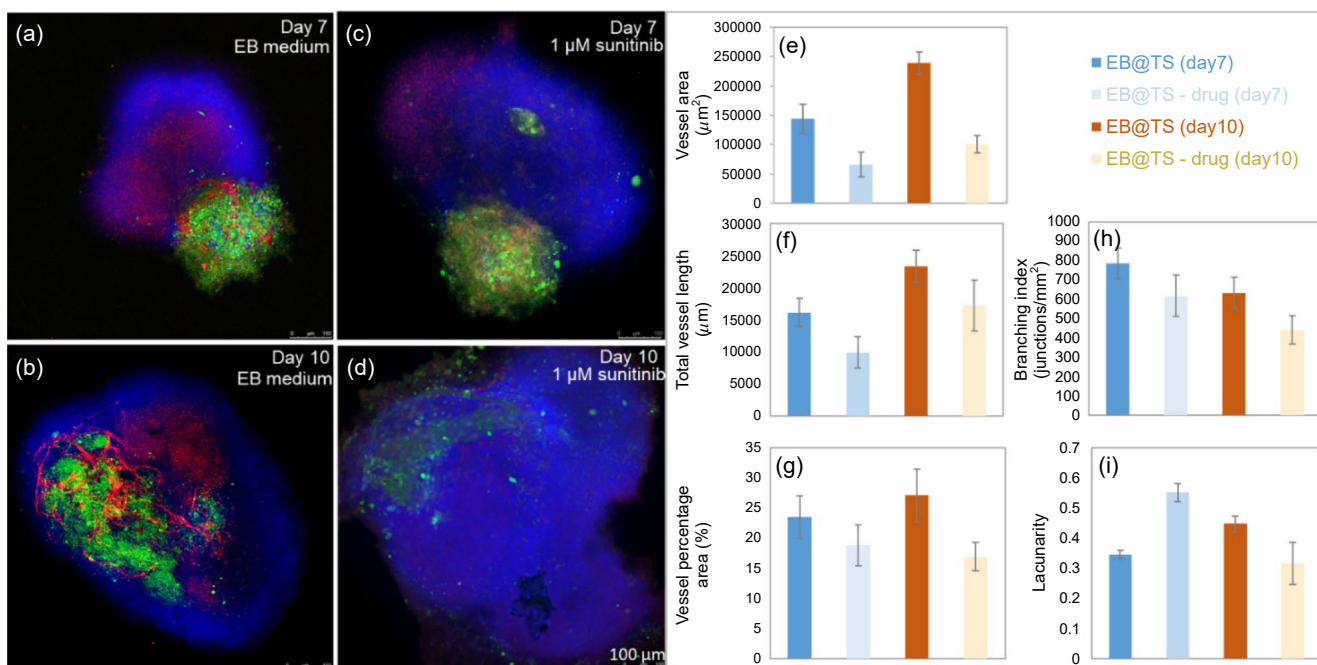


圖 6. 使用 EB 和 MDA-MB-231 形成的 TS 進行腫瘤血管生成以及藥物測試實驗結果。(a)、(c) 在培養第七與 (b)、(d) 第十天利用共軛焦顯微鏡拍攝之照片。(e)-(i) 量化呈現之 (e) 血管面積, (f) 血管總長度, (g) 血管百分比面積, (h) 血管分支指數, 和 (i) 血管空隙性。

法時繁瑣且不容易控制的手動操作^(7, 8)，因此可以簡化操作並提高球體共培養實驗的成功率。透過使用小鼠胚胎幹細胞 (ES-D3) 和乳腺癌細胞 (MDA-MB-231) 所形成的類胚胎體和腫瘤細胞球體來進行共培養，本研究展示了可以利用這項裝置進行腫瘤血管生成模型和其抗血管生成藥物測試之可行性。此 μ -CCD 裝置除了可以用在體外腫瘤誘導的血管生成研究的實驗以外，也可用於其他包括腦科學以及癌症⁽⁹⁻¹¹⁾ 等需要進行三維細胞球體共培養實驗之研究。

參考文獻

1. Weis SM, Cheresch DA, *Nature Medicine*, **17** (11), 1359 (2011).
2. Lee SW, Kwak HS, Kang M-H, Park Y-Y, Jeong GS, *Scientific Reports*, **8** (1), 2365 (2018).
3. Wang HF, Ran R, Liu Y, Hui Y, Zeng B, Chen D, Weitz DA, Zhao CX, *ACS Nano*, **12** (11), 11600 (2018).
4. Ko J, Ahn J, Kim S, Lee Y, Lee J, Park D, Jeon NL, *Lab on a Chip*, **19** (17), 2822 (2019).
5. Park JY, Morgan M, Sachs AN, Samorezov J, Teller R, Shen Y, Pienta KJ, Takayama S: *Microfluid Nanofluid*, **8** (2), 263 (2010).
6. Zudaire E, Gambardella L, Kurcz C, Vermeren S, *Plos One*, **6** (11), e27385 (2011).
7. Wartenberg M, Donmez F, Ling FC, Acker H, Hescheler J, Sauer H, *FASEB J*, **15** (6), 995 (2001).
8. Wartenberg M, Finkensieper A, Hescheler J, Sauer H, *Methods Mol Biol*, **331**, 313 (2006).
9. Zhang YM, Hu QF, Pei YQ, Luo H, Wang ZX, Xu XX, Zhang Q, Dai JL, Wang QQ, Fan ZL et al., *Nat Commun*, **15** (1), 2024.
10. Ozguna A, Lombonia DJ, Aylsworth A, Macdonald A, Staines WA, Martina M, Schlossmacher MG, Tauskelai JS, Woulfe J, Variola F, *Mater Today Bio*, **5** (25), 100992 (2024).
11. Meng XL, Yao D, Imaizumi K, Chen XY, Kelley KW, Reis N, Thete MV, McKinney AA, Kulkarni S, Panagiotakos G et al., *Nature*, **622** (7982), 359 (2023).

作者簡介

羅明心博士為國家衛生研究院生醫工程與奈米醫學研究所博士後研究員。

Dr. Didem Rodoplu Solovchuk (羅明心) is a Postdoctoral Research Fellow in the Institute of Biomedical Engineering and Nanomedicine at National Health Research Institutes.

謝菲尼小姐為國家衛生研究院生醫工程與奈米醫學研究所研究助理。

Jefunnie Sierra Matahum (謝菲尼) was a research assistant in the Institute of Biomedical Engineering and Nanomedicine at National Health Research Institutes.

許佳賢博士為國家衛生研究院生醫工程與奈米醫學研究所研究員，以及國立清華大學奈米工程與微系統研究所和國立中興大學組織工程與再生醫學博士班學程合聘教授。

Dr. Chia-Hsien Hsu is a Principal Investigator in the Institute of Biomedical Engineering and Nanomedicine at National Health Research Institutes. He also holds joint faculty positions in the Institute of NanoEngineering and Microsystems of National Tsing Hua University, and in the Doctoral Program of Tissue Engineering and Regenerative Medicine at National Chung Hsing University.