

器官晶片結合介電泳技術應用於 肝癌藥物篩選

Integration of Dielectrophoresis Technology with Organ-on-a-chip for Screening Liver Cancer Drug

趙梓茵、施采妤、王曉涵、孫偉倫、李岡遠、王克舜、劉承賢

Zih-yin Chao, Tsai-Yu Shih, Xiao-Han Wang, Wei-Lun Sun, Kang-Yun Lee, Ke-Shun Wang
Cheng-Hsien Liu

癌症治療一直是醫學研究的焦點，研究學者利用不同的方式精進癌症治療的方式，包括研究致病機制、診斷用的生物標誌、以及不同的治療方式，其中微流體技術是一門透過生物相容性材料與工程技術的結合，在體外精準模擬人體器官組織的環境，藉此方式可透過不同的晶片設計達到不同的研究方式。特別是肝癌，每年約八十萬的患者被診斷出罹患肝癌，且每年約七十萬人因肝癌過世，迫切需要更好的方式增進藥物治療的效果。透過微流道設計出不同的腫瘤微環境陣列式腔室，包括不同的氧氣濃度、酸鹼值濃度、以及利用工程方式增加抗藥性的環境，提高了測試的多樣性並縮短了實驗時間。晶片的微環境利用常用的免疫治療、化療、以及標靶藥物測試，驗證上述的變因與患者治療之相關性。微流道晶片的使用可提供更多元以及複雜的微環境，以期在短期內實現精確的個人化用藥。

The treatment of cancer has consistently been a primary focus of medical research. Microfluidic technology and highly biocompatible materials simulate the physiological conditions of human organs and tissues in vitro. This approach is utilized to create various biomedical chips that mimic the complex environment of tumor microenvironments. Through the utilization of minute quantities of samples and chemicals, precise experimental outcomes can be achieved. Furthermore, our design includes multiple array-type chambers that feature distinct tumor microenvironments. The chambers regulate diverse conditions, including oxygen and pH concentrations, and employ dielectrophoretic force to facilitate interactions between cancer cells and fibroblasts. The presence of multiple chambers enables the concurrent performance of diverse biological detections and drug selections on a singular chip, thereby improving experimental efficiency and minimizing the duration of experiments. It is anticipated that personalized chips will be employed in evaluating immunotherapy, chemotherapy interventions, or targeted drugs to assess the extent to which external factors influence the relationship between test outcomes and patient therapy. The objective is to enhance the accuracy of auxiliary treatment information provided by the chip, facilitate more precise personalized medicine for diverse patients in the future, and alleviate medication-induced discomfort. This novel organ chip offers an efficient and cost-effective platform for drug development in cancer treatment and pathological research. It also functions as a crucial point of reference for clinical interventions and facilitates the creation of a personalized chip tailored to the patient's sample.

一、器官晶片技術背景

隨著全球疾病的日益嚴重，癌症治療一直是醫學研究的焦點，特別是肝癌，每年約八十萬的患者被診斷出罹患肝癌，且每年約七十萬人因肝癌過世，迫切地需要更好的方式增進藥物治療的效果。現代研究已揭示了腫瘤周邊微環境對於癌症治療的關鍵作用。腫瘤微環境通常為癌細胞提供了有利的生長條件，其中包含了缺氧環境和腫瘤組織周遭弱酸環境，因此改變這種微環境對治療至關重要。為此，我們首先建立能夠調控氧氣濃度環境的陣列式晶片，進行化療藥物的組合選取。其次在晶片上添加酸鹼值變化的濃度條件，觀察免疫以及化療藥物組合治療的效果。再進一步利用電極結構創造肝癌腫瘤的環境，以介電泳力緊密排列癌細胞與纖維母細胞，再進行藥物的篩選。此仿生肝晶片平台的優勢在於：能有系統性及穩定地觀察，以取代傳統單一細胞，平面測試的過於單純化的系統。透過微量、精度、以及效率的優勢，有助於制定個人化的治療方案。

生物微機電系統 (BioMEMS) 是指細胞和分子等生物成分與微型化機電系統的整合。這個跨學科領域結合了生物學、微加工、電子學和機械學的原理，創造出可以與生物實體相互作用的設備和系統，製成相關晶片，用以執行醫療檢驗，環境檢測等一系列需求。生物晶片可以分為三大類，(1) 大量平行實驗的處理，即微陣列型生物晶片 (microarray)；(2) 微流體技術與生物技術的功能整合，稱為全微分析系統 (micro-total analysis system) 或實驗室晶片 (lab-on-a-chip)；(3) 在生醫晶片上建立仿生環境用以相關的生物醫學研究 (organ-on-a-chip)。此外，生醫晶片可以透過持續灌流、細胞共培養 (cell co-culture) 等結構來模擬人體內細胞生長的環境。生醫晶片同時也具有整合性，藉由串聯多種器官晶片，達到模擬全人體功能的效果。與傳統的體內實驗相比，微流體系統在樣品的量少、實驗時間短和操作成本低方面也具有卓越的優勢，可以更有效率地篩選出適合用於治療的腫瘤微環境，且相較動物實驗所引發的道德爭議以及與人體環境不符之疑慮，微流道晶片可能更適合於測試腫瘤微環境。

二、腫瘤微環境 (Tumor Microenvironment)

腫瘤微環境是指腫瘤細胞周圍的環境，包括細胞和細胞外基質之間的相互作用。它是一個複雜的生態系統，由腫瘤細胞自身和周圍正常細胞組成，例如纖維母細胞、免疫細胞、內皮細胞、周細胞還有神經元等組成。腫瘤微環境中，腫瘤細胞和正常細胞之間通過多種細胞因子、生長因子和細胞信號進行交流與相互作用。這種相互作用影響了腫瘤的生長、侵襲、轉移和治療反應。在腫瘤微環境中，正常細胞對腫瘤細胞的影響包括：

1. 纖維母細胞：促進腫瘤生長和侵襲，促進血管增生，提供腫瘤細胞所需的營養和氧氣供應。
2. 免疫細胞：會抑制免疫監控，幫助腫瘤細胞逃避免疫監視。這可能導致免疫耐受，使免疫系統難以識別和攻擊腫瘤細胞。
3. 內皮細胞和周細胞 (pericytes)：在血管的形成和穩定性方面有著重要作用，同時也參與腫瘤侵襲和轉移過程。腫瘤與免疫細胞之間的作用也同時受到血管內皮細胞的影響調控。周細胞則建構了轉移細胞的巢穴，促進癌細胞生長，以及透過旁分泌 (paracrine) 的作用產生抗藥性，包括透過極化腫瘤相關的巨噬細胞進行調控。
4. 神經元：與腫瘤相互作用，可能調節腫瘤的生長和轉移。

腫瘤微環境在癌症的發展和治療方面扮演著關鍵角色，了解腫瘤微環境的複雜性和相互作用，有助於開發更有效的癌症治療策略。

2.1 缺氧環境

缺氧是腫瘤的共同特徵之一，它主要是由於腫瘤中心區域的血液供應無法有效提供足夠的氧氣和營養物質所致。腫瘤細胞對缺氧的反應可能取決於暴露的持續時間，一些腫瘤細胞可能會適應缺氧的刺激並存活下來，其方法大部分是由 HIF-1 α 的基因表達路徑調控的，它促使腫瘤細胞表現更具侵略性的特徵⁽¹⁾，這可能導致腫瘤細胞的壞死或增加對治療的抵抗性，腫瘤中發現的氧氣含量嚴重降低導致大量促癌轉錄因數的啟動，這些轉錄因數促進腫瘤進展、血管生成、癌症幹細胞更新和轉移。由於 DNA 損傷的固定減少、細胞週期停滯、細胞增殖減少、基因和蛋白表達調節以及遺傳不穩定，缺氧能夠影響癌細胞的耐藥性。

而 HIF-1 α 的表達調控，也因缺氧非依賴性而可以通過氧化還原敏感機制上調表現量。其中的功能對於哺乳動物對全身的氧含量水平的細胞反應中具有重要作用。HIF-1 α 的蛋白活性受到許多轉譯後修飾的調節：羧基化、乙醯化和磷酸化調控⁽²⁾，主要功能包括：

1. 感知氧氣濃度：HIF-1 α 蛋白負責感知細胞周圍的氧氣濃度。在正常氧氣供應情況下，HIF-1 α 會受到一種特殊的蛋白質 (von Hippel-Lindau, VHL) 的降解，從而保持在低水平。然而，在低氧環境中 (缺氧或低氧條件)，HIF-1 α 蛋白不會被降解，而會積累在細胞核內。
2. 調控基因表達：HIF-1 α 蛋白在細胞核內積累後，與另一蛋白質 HIF-1 β 結合，形成 HIF-1 複合物。HIF-1 複合物可以結合到特定的 DNA 區域，這些區域通常位於一些氧敏感基因的啟動子區域上。這樣，HIF-1 複合物能夠刺激活化或抑制一系列基因的表達，從而調控細胞的生理和代謝過程，以適應低氧環境。
3. 促進血管生成：HIF-1 α 也可以促進新的血管生成，這在缺氧組織或腫瘤中尤為重要。這個情況下可以誘導一些生長因子的表達，其中包括血管內皮生長因子 (VEGF)，這有助於血管形成，以改善氧氣供應⁽³⁾。
4. 調控代謝：HIF-1 α 還影響細胞的代謝途徑。在低氧條件下，HIF-1 α 可以推動細胞將代謝途徑從氧氣依賴型切換到無氧代謝，以確保細胞在氧氣供應有限的情況下仍能生存⁽⁴⁾。在常氧條件下，由 VHL 引起的途徑會迅速降解 HIF-1 α ；然而，在缺氧下，HIF-1 α 蛋白降解被阻止，並且因為 HIF-1 β 的關係積累下來，進而對下游目標基因發揮轉錄作用。

2.2 弱酸環境

癌細胞是一種不正常增生的突變細胞，不受控制迅速增殖的腫瘤團塊限制了周邊血液以及氧氣供應，因此癌細胞經常處於缺氧與養分不足等多重壓力環境中，如圖 1 所示。癌細胞利用有氧糖酵解進行細胞代謝，從而導致葡萄糖攝取率增加，儘管有氧氣存在，但仍傾向於產生乳酸，所產生的過量乳酸與氫離子等酸性物質來不及回到血液系統而堆積於細胞外，致使腫瘤組織周遭微環境的酸鹼度從原本正常的弱鹼性 (pH 7.4 \pm 0.05)，逐漸變成弱酸性 (pH 6.0~6.9) 之特殊現象⁽⁵⁾。此外這種弱酸環境也可能是引發更惡性的癌症表現型之重要因素。目前已發現許多跨腫瘤細胞的膜轉運蛋白用於平衡癌細胞中的 pH 值，進一步可以透過膜轉運蛋白來操縱癌細胞微環境 pH (pHe) 和細胞中 pH (pHi) 比率，誘導癌細胞凋亡，提高治療效率。

由於癌細胞的異質性使然，儘管目前有相當多種治療方式，癌症依然是難以痊癒的疾病，使相關的治療具有挑戰性。其中腫瘤周圍的微環境在癌症進展和治療抗藥性中起著至關重要的作用。因其包括血液供應、免疫細胞和支持組織等因素，可以為癌細胞提供保護性生

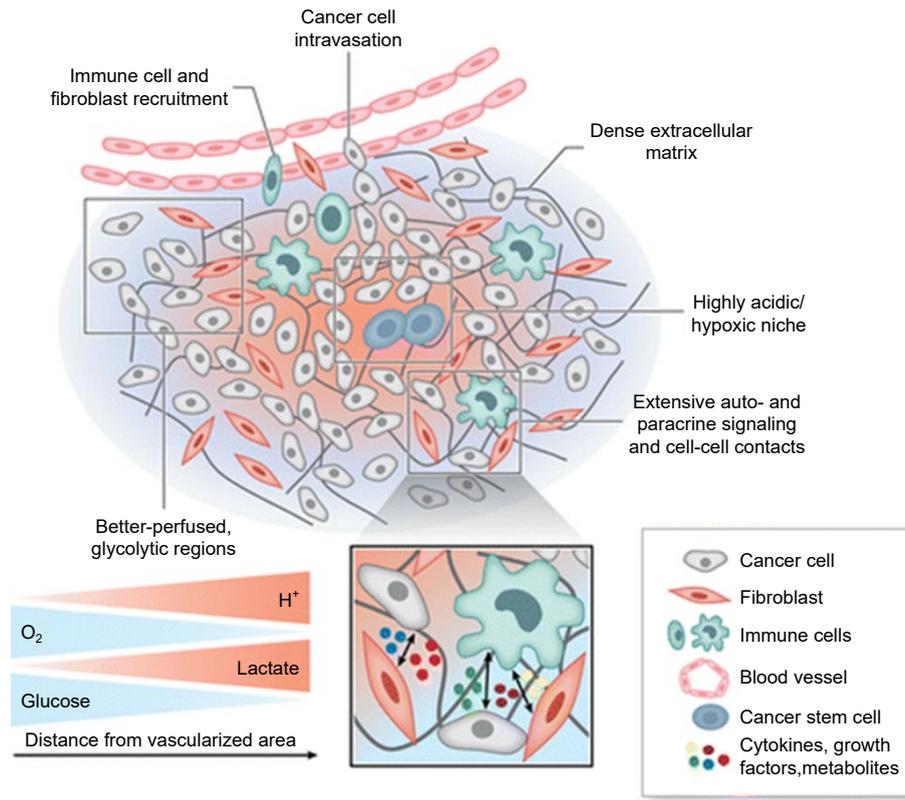


圖 1. 腫瘤微環境⁽⁶⁾。

態，使得藥物難以到達並有效靶向惡性細胞，讓治療癌症過程更加的困難。再加上許多癌症治療，例如化療和放射治療，都會損害正常的健康組織，導致病人的身體更加虛弱，在治療後容易復發，甚至對腫瘤產生抗藥性。因此如何提高癌症治療效率，是現今醫學上的一大挑戰。

三、粒子介電泳理論 (Dielectrophoresis, DEP)

1978 年，H. A. Pohl 表示一個介電粒子若處於不均勻電場中而產生運動，此現象為粒子介電泳⁽⁷⁾。造成粒子所需的力不需要粒子本身帶電，並且粒子在電場環境中皆存在介電泳現象，只是會根據粒子本身的電學性質與物理性質 (大小或形狀) 以及環境條件而影響此現象的發生程度。透過 DEP 公式：

$$F_{dep} = 2\pi a^3 \epsilon_m \text{Re}(f_{CM}) \nabla E^2$$

可得知，介電泳力將由粒子半徑、溶液介電常數、極化因子和電場梯度平方決定。電場下的介電泳力 (F_{dep}) 的符號主要受極化因子 (f_{CM}) 的影響，該極化因子是 Clausius-Mossotti 因子，縮寫為 CM 因子：

$$f_{CM} = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m}$$

由於介電粒子在不均勻電場中會受到電場的誘導而被極化，於粒子平行電場的兩端產生大小相等但電性相反的電荷，而我們可以根據粒子能夠被極化的程度來將粒子介電泳分為正介電泳 (positive dielectrophoresis, pDEP) 與負介電泳 (negative dielectrophoresis, nDEP)，如圖 2。當粒子極化程度比環境介質還大時，粒子會往強電場方向移動，即正介電泳；反之，若粒子極化程度比環境介質還小時，粒子則往弱電場方向移動，即負介電泳。

1. 正介電泳效 (positive DEP, pDEP, $f_{CM} > 0$) :

粒子極化能力比溶液強，由於電荷異性相吸，在粒子表面的電荷會與溶液內的相異電荷相吸，使粒子誘發出較多電荷，造成粒子與溶液有一由上往下（負電荷至正電荷）之電偶極矩，此時電偶極方向和電場方向相同，因此粒子會被吸引至較強電場分佈區域，稱為正介電泳效應。

2. 負介電泳效應 (negative DEP, nDEP, $f_{CM} < 0$) :

粒子比溶液的極化能力弱，溶液誘發出的電荷影響較大，使粒子與溶液介面受到一由下向上 (正電荷至負電荷) 與電場方向相反之電偶極矩作用，於是粒子被排斥至較弱電場分佈的區域，此時稱為負介電泳效應。

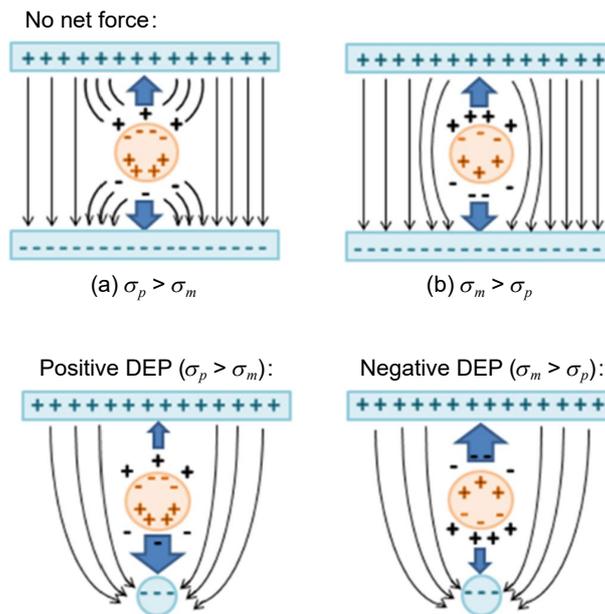


圖 2. 正負介電泳現象示意圖。

四、器官晶片用於肝癌治療

4.1 肝癌與癌症治療抗藥性

細胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 佔原發性肝癌組織學亞型的 80% 以上，排名全球第四大癌症相關死因^(8,9)。HCC 的腫瘤發生有很多因素，包括慢性 B 型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染、慢性 C 型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 感染和飲酒⁽¹⁰⁻¹³⁾。所有這些致病因素都可能造成肝損傷、慢性疾病並促進肝硬化的發展，導致肝衰竭和肝癌發生⁽¹⁴⁾。如果患者在早期被診斷出來，建議採取手術切除、射頻燒灼術 (radiofrequency ablation，

RFA) 和肝臟移植等治療方法以達到完全治療的目的^(15, 16)。然而，對於診斷為無法手術的患者，例如處在局部晚期或有遠端轉移，巴塞隆納臨床肝癌分期 (Barcelona clinic liver cancer classification, BCLC) B 級的患者建議以肝動脈栓塞化學療法 (TACE) 治療，C 級的患者則是化療、標靶治療及免疫治療⁽¹⁷⁻¹⁹⁾。由於肝細胞癌分子作用機制目前仍然未知，為了瞭解腫瘤微環境是如何影響抗癌藥物抗藥性的產生及其分子機轉，我們需要在體外重新構建肝細胞癌腫瘤，並研究癌相關纖維細胞和腫瘤相關內皮細胞如何促進肝癌細胞產生抗藥性。

4.2 肝結構模型

對肝結構常見的描述有兩種，分別為肝小葉模型以及肝腺泡模型，肝小葉模型強調的是肝的外分泌性質，血液循環的方向為肝門靜脈一開始會從最靠近六角結構外側的肝細胞漸漸的滲透至靠近中央靜脈區的肝細胞，並於最後才會入中央靜脈。

近年來，由於病理學的知識日進漸增，因此提出了新穎的模型即為肝腺泡的概念，此種模型強調的是肝的代謝功能，會根據肝內的循環血流以及肝細胞的關係建立而成的，肝腺泡是由兩個相鄰的各六分之一的肝小葉所組成的，其面積約為三分之一個肝小葉的大小，被認為是具有肝臟功能的最小單位，也是肝臟最小的結構單位。因此需要在體外重新構建肝細胞癌腫瘤，如圖 3(c) 所示，並研究癌相關纖維細胞和腫瘤相關內皮細胞如何促進肝癌細胞產生抗藥性。

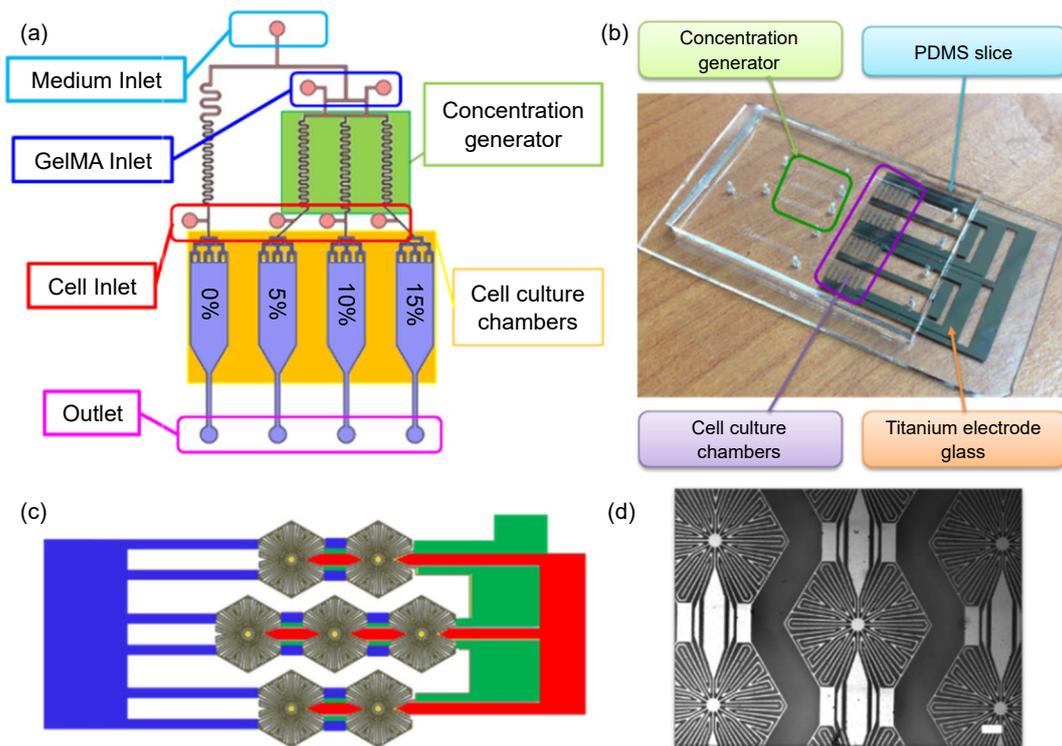


圖 3. 模擬肝小葉器官晶片的設計。(a) 示意圖顯示模擬肝小葉器官晶片配置：濃度產生器、細胞培養室、一個介質入口、兩個 GelMA 入口、四個細胞入口和四個出口。(b) 透過軟光刻製造微通道的 PDMS，然後使用氧電漿使其與印有鈦電極的基板玻璃黏合。(c) 三種不同的顏色代表三個獨立的鈦電極。電極架構是由六邊形圖案組成的陣列。實際設計中，一個細胞培養室有 13 組電極圖案。(d) 晶片上 DEP 鈦電極的顯微鏡影像。

4.3 模擬肝小葉器官晶片之設計

此肝小葉模擬器官晶片，由三個組成組件：(1) 濃度梯度產生器，(2) 介電泳細胞圖案，(3) 細胞培養室提供培養微環境 (圖 3)。使用 NIH-3T3 (小鼠胚胎成纖維細胞系) 和 HepG2 細胞 (C3A、人類肝癌細胞系)，並透過介電泳 (DEP) 進行圖案化以重建肝小葉的徑向輻射對稱的組織。圖案化的細胞上覆蓋著一層專門的稱為 GelMA 的水凝膠可用於共同培養兩種細胞。

當對電極施加電壓時，六角形電極會產生非均勻電場梯度。透過 DEP 力，肝癌細胞和癌症相關纖維母細胞 (或腫瘤相關內皮細胞) 被引導至六邊形電極的圓形區域，形成類似人體肝小葉的組織構造。

五、晶片應用

在成功建置模擬肝小葉的器官晶片後，我們可以利用其能夠共培養肝癌細胞與癌症相關纖維母細胞 (或腫瘤相關內皮細胞) 的能力，模擬人體內腫瘤微環境，並作為手術後的藥物選擇依據。因癌細胞與癌症相關纖維母細胞 (或腫瘤相關內皮細胞) 共培養時對藥物的反應

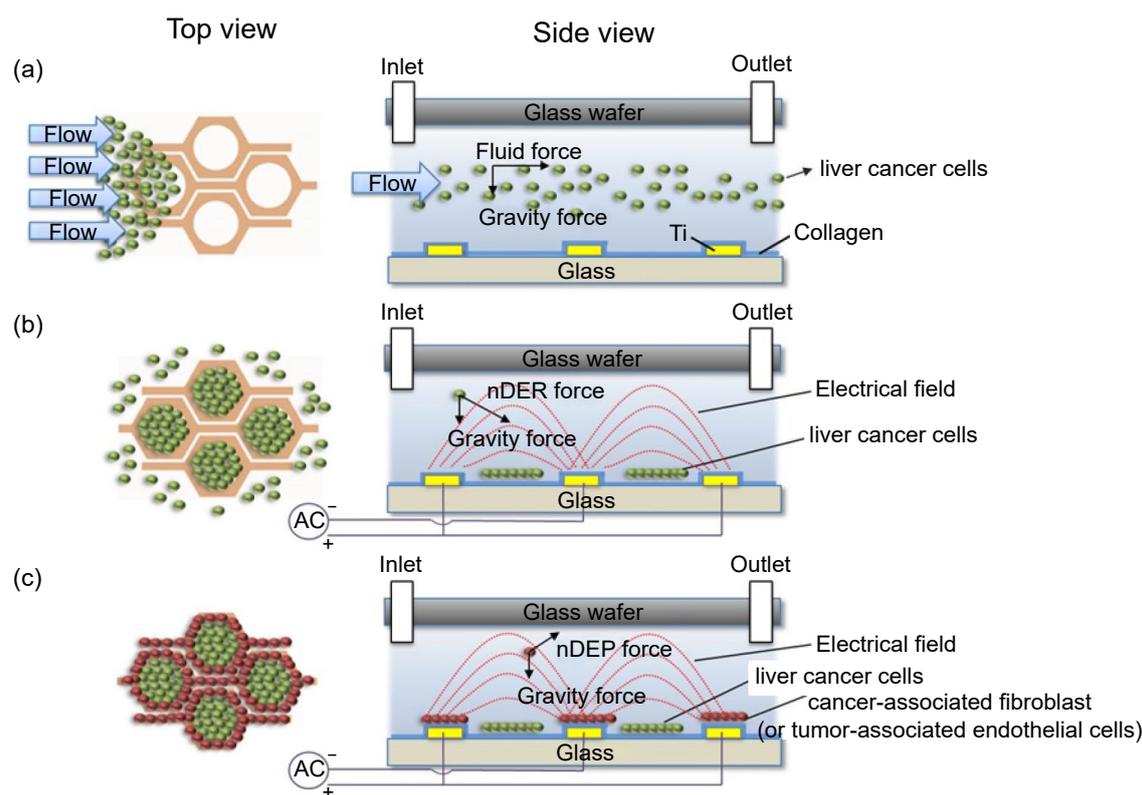


圖 4. 透過 DEP 力形成細胞圖案的示意圖。(a) 用 DEP 緩衝液處理的肝癌細胞被引入生物反應器室並隨機分佈。(b) 施加電壓使產生負 DEP 力，肝癌細胞被引導至六邊形電極的圓形區域。(c) DEP 緩衝液被替換為細胞培養液，使肝癌細胞與基板充分黏附，的細胞培養基癌細胞。確保肝癌細胞黏附後，重複步驟 (a)、(b)、(c) 來操作 pDEP 使癌症相關纖維母細胞 (或腫瘤相關內皮細胞) 分布於六角形電極的邊緣。

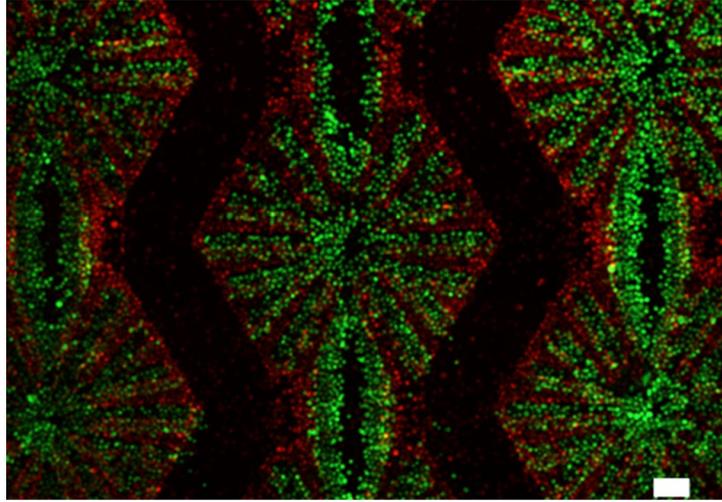


圖 5. 呈特殊圖案排列之肝癌細胞和癌症相關纖維母細胞，綠色螢光為肝癌細胞，紅色螢光纖維母細胞。

會與藥物直接施加在肝癌細胞上有所不同，可能產生比預期更高的抗藥性，在臨床診斷中，透過小型化提高實驗的精度和效率，減少樣品和試劑體積，同時提高分析速度，協助實現藥物治療的個體化，提供即時、準確的藥物反應數據，有助於制定個人化的治療方案。

參考文獻

1. G. L. Semenza, *Biochem. Pharmacol.*, **59** (1), 47 (2000).
2. "HIF1A," *Wikipedia*. Mar. 27, (2024), please refer to the website: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=HIF1A&oldid=1215901101>
3. G. L. Semenza, *Nat. Rev. Cancer.*, **3** (10), 721 (2003).
4. G. S. Falchook *et al.*, *Oncotarget*, **5** (21), 10280 (2014).
5. “為何癌細胞不怕酸中毒！？國衛院發現癌細胞適應酸性微環境壓力機轉”，國家衛生研究院. (2024). Please refer to the website:: <https://www.mohw.gov.tw/cp-5275-72857-1.html>
6. E. Boedtker and S. F. Pedersen, *Annu. Rev. Physiol.*, **82**, 103 (2020).
7. H. A. Pohl, *Dielectrophoresis: The Behavior of Neutral Matter in Nonuniform Electric Fields*. Cambridge; New York, (1978).
8. Global Burden of Disease Cancer Collaboration *et al.*, *JAMA Oncol.*, **3** (4), 524 (2017).
9. J. D. Yang, P. Hainaut, G. J. Gores, A. Amadou, A. Plymoth, and L. R. Roberts, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **16** (10), 589 (2019).
10. L. Kulik and H. B. El-Serag, *Gastroenterology*, **156** (2), 477 (2019).
11. J. F. Perz, G. L. Armstrong, L. A. Farrington, Y. J. F. Hutin, and B. P. Bell, *J. Hepatol.*, **45** (4), 529 (2006).
12. J.-W. Park *et al.*, *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver.*, **35** (9), 2155 (2015).
13. P.-H. Huang *et al.*, *J. Cancer.*, **10** (23), 5735 (2019).
14. S. K. Asrani, H. Devarbhavi, J. Eaton, and P. S. Kamath, *J. Hepatol.*, **70** (1), 151 (2019).
15. J. A. Marrero *et al.*, *Hepatol. Baltim. Md.*, **68** (2), 723 (2018).
16. M. Omata *et al.*, *Hepatol. Int.*, **11** (4), 317 (2017).
17. K.-H. Liang *et al.*, *Pharmacogenomics*, **17** (4), 353 (2016).
18. C.-L. Lin *et al.*, *Scand. J. Gastroenterol.*, **49** (12), 1456 (2014).
19. C.-T. Yeh *et al.*, *BMC Cancer.*, **11**, 117 (2011).

作者簡介

趙梓茵小姐現為國立清華大學奈米工程與微系統研究所碩士生。

Zih-Yin Chao is currently a M.S. student in the Institute of NanoEngineering and MicroSystems at National Tsing Hua University.

施采妤小姐現為國立清華大學奈米工程與微系統研究所碩士生。

Tsai-Yu Shih is currently a M.S. student in the Institute of NanoEngineering and MicroSystems at National Tsing Hua University.

王曉涵小姐現為國立清華大學動力機械工程學系碩士生。

Xiao-Han Wang is currently a M.S. student in the Department of Power Mechanical Engineering at National Tsing Hua University.

孫偉倫小姐為荷蘭拉德堡德大學醫學中心生醫博士，現為論泰生技執行長。

Wei-Lun Sun received her Ph.D. in Biomedicine Sciences, Radboud University Medical Centre, Nijmegen. She is currently a Chief Executive Officer in Pythia Biotech Ltd.

李岡遠醫師為英國倫敦大學帝國學院國立心肺研究所博士，現為臺北醫學大學副校長、臺北醫學大學醫學院 / 醫學系 / 內科學科教授，論泰生技共同創辦人。

Kang Yun Lee received his Ph.D. from Imperial College London. He is currently an Executive Vice President of Taipei Medical University and a Professor at Internal Medicine, School of Medicine, and College of Medicine, Taipei Medical University. He is also a Co-founder of Pythia Biotech Ltd.

王克舜先生為美國密西根安得魯斯大學企業管理碩士，現為論泰生技董事長。

Ko-Shun Wang received his M.S. in the School of Business Administration from Andrews University. He is currently a Chairman of the board in Pythia Biotech Ltd.

劉承賢先生為美國史丹佛大學機械工程博士，現為國立清華大學動力機械工程學系 / 奈米工程與微系統研究所 / 半導體學院 / 精準醫療博士學位學程 / 智慧生醫博士班學程教授，論泰生技共同創辦人。

Cheng Hsien Liu received his Ph.D. in Mechanical Engineering from Stanford University. He is currently a Professor in the Department of Power Mechanical Engineering / Institute of NanoEngineering and MicroSystems / College of Semiconductor Research / Precision Medicine Ph.D. Program / Ph.D. Program in Biomedical Artificial Intelligence at National Tsing Hua University. He is also a Co-founder of Pythia Biotech Ltd.