

基于细胞水平药物筛选的微流控芯片系统研究进展

庞磊, 马立东, 孟宪生*, 包永睿, 王帅(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

摘要: 进入 21 世纪以来, 药物筛选技术正朝着快速、高效的细胞水平筛选方面发展, 微流控芯片技术作为现代生命科学领域的重要研究工具, 以其分析微型化、高通量化、可集成化和良好的生物相容性等特点, 在细胞水平药物筛选方面引起了广泛关注, 并取得了一系列成果。国家“十二五”规划中启动科技重大专项“基于微流控芯片的新药研究开发关键技术”, 使得微流控芯片在药物筛选领域的研究达到了一个新的高度。本文主要综述了近年来基于细胞水平药物筛选的微流控芯片系统的研究进展, 并对其应用前景进行了展望。

关键词: 微流控芯片; 细胞培养; 药物筛选; 研究进展

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)12-1518-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.12.027

Advances of Microfluidic Chip System in Cell-based Drug Screening Research

PANG Lei, MA Lidong, MENG Xiansheng*, BAO Yongrui, WANG Shuai(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

ABSTRACT: Since entering the 21st century, drug screening technology is developing fast and efficiently towards to the cellular level screening. As a promising platform for the exploration of modern life science, microfluidic chip technology, with its analysis of miniaturization, qualcomm quantitative, can be integrated and good biocompatibility, etc, has attracted increasing attention on cell-based drug screening, and adopted a series of achievements. In the 12th five-year plan, our country started the science and technology major projects, making microfluidic chip reached a new height in the field of drug screening. In this paper, the microfluidic chip system based on a cellular level of drug screening in recent years are reviewed. In addition, the further applications of microfluidic chip are prospected based on the current development.

KEY WORDS: microfluidic chip; cell culture; drug screening; research progress

20 世纪 90 年代, 为了适应对生物样品进行更灵敏、更高效、快速分离分析的需要, 瑞士的 Manz 和 Widmer 等首先提出微全分析系统(miniaturized total analysis systems, μ TAS)的概念^[1], 如今这种以微机电加工技术为基础的系统已发展为世界上最前沿的科技领域之一, 其核心技术是微流控芯片系统或称芯片实验室, 指将常规化学和生物等领域中所涉及的样品制备、反应、分离、检测等基本操作单元集成或基本集成到一块几平方厘米的芯片上, 具有快速检测分析、信息量大、高通量等优点^[2-3]。在最近的十几年里, 该系统被广泛应用在生命科学、疾病诊断与治疗、药物合成与筛选等领域, 已经成为 21 世纪最为热门的前沿技术之一^[4]。

药物筛选是从天然或合成的化合物中筛选出高效的新药或先导化合物, 对其进行生物活性和药理作用检测, 并根据检测结果评价某一物质的药用前景, 是新药研究的最初过程和关键步骤, 目的是发现新药。但是传统的药物筛选过程复杂, 效率低下, 且成本昂贵, 不能适应大规模样品的同时筛选, 因此需要开发效率更高的药物筛选方法。近年来, 随着细胞生物学技术的迅速发展, 基于细胞水平的高通量、高内涵筛选为新药筛选提供了途径。细胞水平药物筛选具有微量化、超高通量化、均质检测的优点, 并可进行多指标、多靶点及多通道检测。而微流控芯片凭借其样品及试剂消耗少、分析速度快、效率高、操作模式灵活多变、集成化优势明显等特点, 为细胞水平

基金项目: “重大新药创制” 国家科技重大专项(2013ZX09507005)

作者简介: 庞磊, 男, 硕士生 Tel: (0411)85890125 E-mail: cyjpl@163.com
(0411)85890125 E-mail: mxsvvv@126.com

*通信作者: 孟宪生, 男, 博士, 教授, 博导 Tel:

高通量、高内涵药物筛选提供了一个优秀的实验技术平台。为推动微流控芯片在药物研究领域的发展,国家“十二五”规划启动科技重大专项“基于微流控芯片的新药研究开发关键技术”。微流控芯片细胞水平筛选方法的出现,给药物发现领域带来了新的生机,使得药物发现进入到了一个更深的层次^[5]。

1 细胞水平药物筛选微流控芯片系统

细胞水平药物筛选微流控芯片系统旨在通过设计有不同功能的芯片来培养细胞,对细胞施加药物刺激,并配合自动化的检测装置,采集药物与细胞相互作用的信号,收集数据,从而分析药物的作用,进行筛选并得到筛选结果。该系统的优点在于通过对样品全分析过程的微缩化和集成化,实现高灵敏的快速检测,高通量输出以及在线自动化操作等功能,较以往的细胞水平筛选技术表现出极大的优势,非常适合药物成分的筛选。

1.1 细胞水平药物筛选微流控芯片的设计

1.1.1 芯片所用材料 要进行细胞培养及药物筛选,首先要对芯片的材料进行选择。用于制作微流控分析芯片的材料有单晶硅、玻璃、石英、金属和有机高聚物,如环氧树脂、聚甲基丙烯酸甲酯(polymethyl methacrylate, PMMA)和聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)等。其中,PDMS 具有良好的生物相容性、毒性低,且有较高的热稳定性及一定的气体通透性,还具有很好的弹性和变形性,加工成型方便,易于集成。另外 PDMS 价格便宜,且表面用等离子体处理后能与各种材料,如 PDMS、硅、玻璃、聚苯乙烯等封接^[6-10]。基于以上优点,PDMS 成为目前绝大部分实验室首选的细胞水平实验芯片材料。

虽然 PDMS 拥有以上诸多优点,但最近很多报道揭示了一些不尽人意的地方。首先,由于水蒸气和有机溶剂能渗透过 PDMS,出现了溶液蒸发和渗透压改变等问题^[11],这对细胞培养是极其不利的。Randall 等^[12]的研究表明,水或乙醇的灌入会降低 PDMS 的透明度并出现雾状水汽,水汽渗透到基材里还会产生渗透驱动的液流。其次,如果长期暴露于 PDMS 环境中,细胞的新陈代谢和增殖也将受到影响。此外,PDMS 形成的微结构不如玻璃等硬性材料稳定,较强的疏水性导致其对一些极性小的分子吸附,对气体的通透性导致其产生气泡,这些缺点有可能限制其在微尺度

细胞分析中的应用。然而 PDMS 的某些缺点可以通过相关处理加以改进,比如对其表面的改性或修饰就是一种拓宽其应用领域的有效方法^[13]。Lee 等^[14]利用无毒、亲水性很好的聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)对 PDMS 表面进行修饰。首先,利用等离子体处理 PDMS 表面,然后浸泡入聚合赖氨酸-聚乙二醇 [Poly-lysine-polyethylene glycol, PLL-g-PEG]共聚物中。由于在等离子处理后,PDMS 表面会产生-OH、COO-基团,聚合赖氨酸(Poly-lysine, PLL)骨架与负电表面结合,PEG 链作为延伸结构,形成 PEG/水界面,起到防止蛋白吸附的作用。Gomez-sjoberg 证明用溶胶-凝胶对 PDMS 芯片进行处理后能减少非极性药物小分子的吸附,并且芯片仍保持较好的生物相容性、透光性和透气性^[15]。

1.1.2 芯片微结构 用于细胞水平相关实验的微流控芯片的微结构,需要考虑以下几点:首先是芯片的尺寸,对于生物学实验来说,除非是单细胞分析,否则一般都要求培养观察区域具有足够的细胞以满足群体统计的要求;另外通道的大小要允许其中的溶液能形成稳定的浓度梯度或能在通道表面改性,这在趋药性实验对细胞微环境的控制中尤其重要^[16-17]。综上,需要较大尺寸的培养通道,微通道的尺寸一般在 100~1 000 μm 。微流控芯片中还需要考虑通道的深宽比,高的深宽比意味着高的表面积体积比,会产生更显著的表面现象,使得更多的界面用来进行物质与能量交换,产生更高效的气体供应及热量传送。Hung 等^[18]研究了在具有较大的深宽比的 PDMS 微流控装置上制作一系列微室,通过连续灌注培养基来培养细胞,实验证明较大深宽比的 PDMS 微室和灌注通道有一些独特的优点,如使细胞在微室内被定位,可以创造一个供细胞生长的均一微环境。

其次要考虑的因素是芯片的构型,用于药物筛选的芯片主要有 2 种构型,单通道设计和阵列式通道设计。前者的通道构型包括十字型、T 型通道等,这类芯片不仅制作简单,而且易于操控,更多应用于理论研究和目标性强的指标测试。阵列式通道设计的芯片在药物筛选中的使用更为普遍,通常由设置许多高密度的具有不同细胞阵列的细胞裸片、封装盖板和底板构成。阵列式通道芯片能通过多种手段控制细胞培养条件,并使得

不同细胞株间的生化反应结果可比性强，一块芯片上可同时进行多信息量检测，更能体现药物筛选中所追求的高通量和高内涵筛选的宗旨。Jeon 等^[19-20]在微流控芯片上设计并制作了如“圣诞树”结构的溶液浓度梯度生成器，开创了芯片上基于浓度梯度药物筛选的先河，具有十分重要的意义。该生成器上端的 3 个进样口可同时注入不同浓度的溶液，溶液在微通道网络中以层流的方式流动，

并以扩散的方式经过多层次的分流、汇流逐渐混合，每个支路包含不同比例的原溶液，最终溶液在圣诞树形的结构底部，即在垂直于样品流动方向形成浓度梯度。这种结构通过设计灵活的网络结构，可形成不同的通道形态和空间构型，从而获得一系列复杂、精确并且是任意的浓度梯度，与其他体外研究体系相比具有许多独特的优势。如图 1 所示。

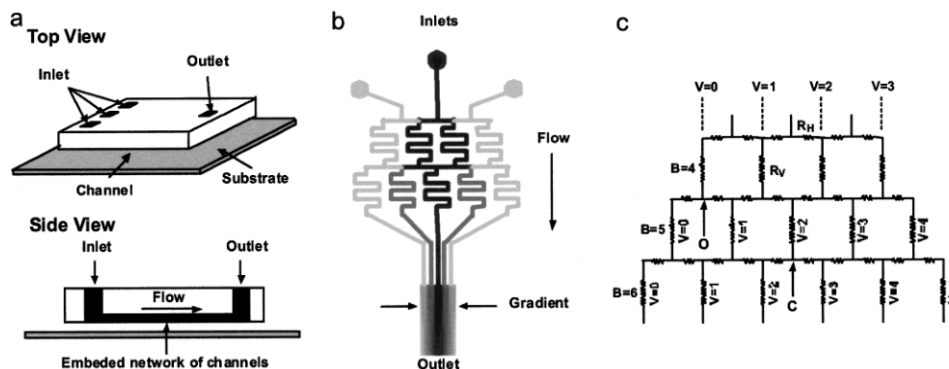


图 1 “圣诞树”结构的溶液浓度梯度生成器

a-基于 PDMS 的微流控浓度梯度发生器的工作原理图；b-浓度梯度微网络设计原理图；c-微流体网络的等效电路图。

Fig. 1 Solution concentration gradient generator for “Christmas tree” structure

a-working principle diagram of the micro fluidic concentration gradient generator based on PDMS; b-concentration gradient micro network design principle; c-equivalent circuit diagram of microfluidic network.

1.2 试样引入及流体控制系统

在微流控芯片上进行细胞水平药物筛选还涉及到细胞的接种、培养液的灌注、药物的运送，药物与细胞的混合等操作，这些操作都离不开对微流体的控制与驱动过程。

在细胞水平微流控芯片上，流体的控制驱动一般都借助于微型泵和阀来完成。这些微阀、微泵、混合装置、驱动器等单元可通过外部的设备和芯片相连，也可以依靠微流控分析系统的集成化优势直接加工集成在芯片上。现如今，流体驱动系统主要分为 2 类：一类是利用自身机械部件运动或压力作用来驱动微流体的机械动力驱动方式，如流动注射泵、气动微泵、电磁微泵等，其在芯片加工和集成方面具有较高难度；另一类是主要靠外场效应实现微流体驱动的非机械驱动方式，包括重力驱动、表面张力驱动、电渗驱动等。目前绝大部分芯片系统都用到外围的泵如注射泵、蠕动泵等来引入试样，这常用于灌注系统中，目的是产生稳定的液流以及时补充新的营养物质同时带走废物。也有实验室采用重力或压力驱动液流的方式将细胞接种到芯片上，相对注射

泵而言简化了设备，降低了成本^[21]。Huang 等^[22]建立了一种可连续进样的集成化重力驱动微流控芯片流动分析系统，可实现连续高通量引入试样，换样时间仅为 15 s，还采用了水平贮液池和出口引流管等重力驱动流体控制技术，显著降低了试剂和样品的消耗，提高分析速度，增加系统连续工作时间。然而重力进样却会导致细胞在入口池中的沉降聚集，消耗营养成分及积累废物的速度较快，这样扩散进通道中的营养成分速度就会较慢，并且培养液的生理性质包括 pH 和气体的浓度都发生了明显的改变。对于重力进样的这些缺点，各国的科学家经过不断研究，提出了若干种改进的方法，最常用的为在重力进样器的下方集成一个输液管，依靠输液管上的滑轮装置来调节重力进样的速度，避免细胞和营养物质在入口池中的沉降聚集。

微流控芯片分析系统的集成化优势非常明显，其相关功能的完成离不开对流体的控制，而流体控制的核心部件是微阀。微阀分为被动微阀和主动微阀。被动微阀通过改变流体自身的流向和压力(如设置不同的流阻)来实现微阀的打开与

关闭, 主动微阀的开启和关闭是靠外界某种驱动, 如气动、压电、相变等来实现的。目前使用最多的是利用弹性材料 PDMS 制作的气动微阀, 这种微阀成本低, 容易制造, 泄漏非常低, 密封性能好, 死体积小, 如图 2 所示。其中比较典型的气动微阀, 其微阀薄膜由 PDMS 制备, 可获得较大的变形, 该装置已被广泛集成于微流控器件中, 实现对微流体的控制^[23]。

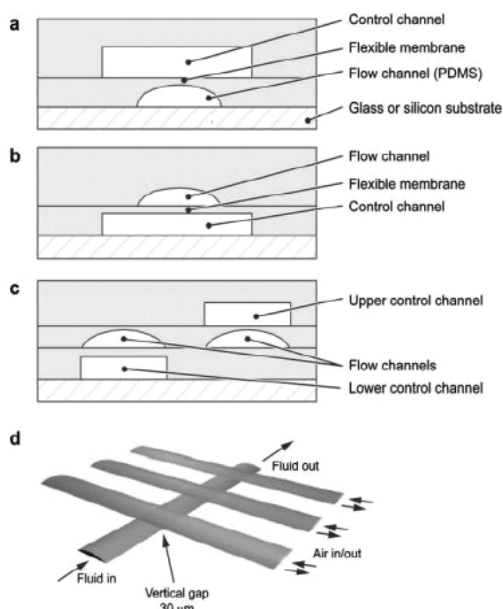


图 2 微阀结构的纵切图

a-双层 PDMS 微阀, 中间为一个薄膜, 流体通道和微阀通道对齐, 上层为流体通道, 下层为微阀通道; b-上层微阀通道, 下层为流体通道; c-三层微阀结构; d-带有三个微阀的微流控模式图。

Fig. 2 The longitudinal structure of micro valve

a-double PDMS micro valve, the middle is a thin film, the fluid channel and the micro channel alignment, the upper layer is the fluid channel for the micro channel; b-a fluid channel in the lower layer of the upper micro channel; c-the 3 layer of the micro valve structure; d-the micro flow control mode with three micro valves.

2 微流控芯片细胞培养

细胞是生物体形态结构和功能的基本单元, 人们要了解生物体生命活动的规律, 必须以研究细胞为基础。微流控芯片细胞培养是芯片上药物筛选过程得以实施的重要基础之一, 芯片多种单元技术的灵活组合使集成化、系统化的细胞培养成为可能, 为分析测试药物与细胞相互作用, 进而筛选具有药理活性的药物成分奠定了基础^[24]。

2.1 微流控芯片细胞培养的优势

细胞培养作为一种常规的细胞研究手段, 已广泛应用于生命科学和医药学等领域。现阶段常规实验室的细胞培养仍依赖于培养皿、瓶和微孔

板等容器。然而传统培养容器不仅操作繁琐、费时费力、试剂消耗大、检测及分析灵敏度低, 而且难以真实反映生理状态下细胞的生物学特征。与传统培养容器相比, 微流控芯片操作所需的细胞量很少, 适合来源稀缺但又十分重要的细胞研究。微流控芯片的微米尺度空间和典型哺乳类动物细胞的尺寸及体内微血管孔径恰好相配; 芯片的多维网络结构形成相对独立、封闭的环境与体内环境类似; 且微通道中的高表面积体积比, 使得更多的界面可以用来进行物质和能量交换, 传递效率提高, 细胞代谢加快; 更可通过对流体的精确控制实现营养物质的实时更新与代谢废物的及时排出。此外, 微流控芯片由于自身的一些特性和优势, 很容易实现二维或三维的细胞培养、全自动化培养和细胞共培养模式, 从而可以建立细胞与细胞、细胞与胞外基质间的相互作用, 使细胞保持完整的生物学特性^[25-27]。微流控芯片细胞培养见图 3。

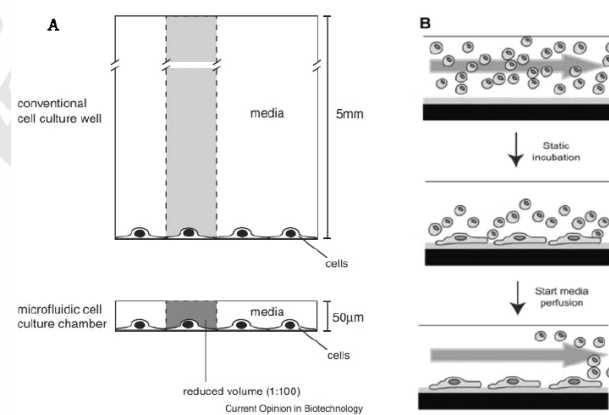


图 3 常规细胞培养和微流控芯片中细胞培养

A-细胞常规培养板和微流控芯片微通道的对比, 芯片的高度为 50 μm , 会导致营养物质的快速消耗和分泌物的大量堆积, 类似细胞在组织中的微环境; B-悬浮细胞在微通道中培养, 为使细胞贴壁需要经历一段静止期, 然后再进行灌注培养。

Fig. 3 Cell culture and cell culture in conventional cell culture and microfluidic chip

A-a cell culture plate and a micro channel of microfluidic chip, the height of the chip is 50 μm , which leads to the rapid depletion of nutrients and the accumulation of a large number of secretions, similar to the micro environment of cells in tissues; B-cultured in the micro channel of the suspended cells in order to make the cell wall need to undergo a period of rest, and then carry on the perfusion culture.

2.2 微流控芯片在细胞培养中的应用

细胞所处的微环境是一个精细整合了多因素的复杂动态环境, 研究人员通过在芯片上对氧气、二氧化碳和温度等外在条件的控制, 已构建出许多前沿性的微流控细胞芯片平台。Forry 等^[28]通过

控制微流控芯片通道内溶液的流畅度来调节 CO_2 的浓度, 这种装置不需要把细胞放入 CO_2 培养箱而能在室外培养 1 周左右。杨才表等^[29]将 ITO 透明导电玻璃与 PDMS 薄膜经氧等离子体作用后共价结合成细胞培养芯片。以 ITO 薄膜为发热材料, 通过电极连入外部温度控制系统来精确控制芯片的温度。实验过程中芯片的控制温度为 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 并且温度上下波动 $<0.5\text{ }^\circ\text{C}$ 。以上研究表明了微流控芯片系统在对细胞培养外在条件控制的可行性。

同时, 为了实现细胞长期及大规模培养, 必须保证有连续的营养供应, 并且能及时清除培养基中的废物。微流控芯片所特有的灌注培养模式能很好地解决这些问题, 为细胞的长期及大规模培养提供了一种新的研究思路和技术平台。Chen 等^[30]应用水平方向阵列微泵作为重力驱动泵系统, 在微流控细胞培养通道内产生多重速率恒定的液流, 延长了供液周期。Hung 等^[31]设计了一种可以批量化培养细胞并进行长期监测的微流控芯片。芯片由 10×10 个细胞培养小室组成, 每个小室周围都有许多细小的流体通道, 流体由 4 个端口通入这个微流控装置可以进行细胞生长周期实时观察分析。

此外, Weltin 等^[32]制作了一种多参数且具有微生理机能测试功能的芯片来检测人体肿瘤细胞的新陈代谢产物。芯片包含细胞培养腔, 流体区以及含有化学生物传感器的代谢物检测区, 同时集成有镀了铂和铱氧化物薄膜的微电极。他们将 T98G 人脑瘤细胞培养在其中, 并采用动态及静态交替的方法培养, 一方面可以维持高效率的培养液更换, 另一方面可以方便地收集未经稀释的样本来进行检测。整套系统能保持长期的稳定性, 且响应灵敏, 不仅可以对细胞进行长期培养, 同时还能对细胞代谢产物的多种指标, 如 pH、氧气含量、葡萄糖消耗和乳酸的产生进行定量的检测。王丽辉等^[33]设计了具有 5 组平行浓度梯度网络和 30 个细胞培养池的微流控芯片, 将细胞接种、培养、梯度浓度化学刺激、标记、检测等功能单元集成在一起。越来越多的研究表明微流控技术已经被成功地用于多种动物细胞培养, 微流控技术将成为各种基于细胞培养实验的一个极其重要的技术平台。

3 微流控芯片细胞水平药物筛选

对药物进行快速筛选和药动力学研究的最初方

法是体内试验(如动物试验), 然而动物试验具有明显的局限性: 效率低、成本高。细胞培养微流控芯片可以将药物的合成、分离、富集, 实验细胞培养, 药物效果检测等多道工序集成到单片的微系统中, 并行性地进行多种药物测试, 使其在药物筛选中的应用日益广泛, 目前已成为发现药物的重要手段^[34]。

3.1 微流控芯片系统细胞水平药物活性成分筛选

关于细胞培养微流控芯片在药物活性成分筛选方面的研究报道很多, 如 Ye 等^[35]构建了一套用于细胞水平药物筛选研究的集成化微流控芯片系统(图 4), 该系统集细胞培养、浓度梯度加样、不同小分子-细胞相互作用等单元操作于一体。芯片结构主体部分是 8 个金字塔形的浓度梯度生成器网络围绕一个公共的废液池, 网络结构单次可产生 64 种药物作用条件并获得 192 种细胞生物信号。他们利用该芯片, 实现了对阿霉素诱导肝癌细胞凋亡过程的监测。同时, 在 2 个功能单元之间设计了具有微小缝隙的坝形结构, 当流速较低时, 此结构既可有效阻挡细胞悬液流入浓度梯度生成单元, 又不影响药物溶液传递。该系统充分体现了微流控芯片将多种单元技术灵活组合和规模集成的特点, 大大简化了实验操作, 显著降低细胞和试剂耗量, 不仅可在一次运行中获得多个实验参数, 而且可以对多种细胞同时筛选, 具有重大应用前景。Wu 等^[36]设计了一种具有“三明治”夹层结构的、细胞水平的阵列式高通量筛选芯片, 通过荧光检测药物与乳腺癌细胞 MCF-7 的相互作用, 筛选出潜在的抗肿瘤药物, 实验采用 9-羟基喜树碱进行实验, 证明其有效可行, 该方法为药物活性成分的筛选提供了一种快速、低成本的途径。Kwon 等^[37]拓展了细胞阵列培养芯片, 设计了具有 2 100 个培养腔的细胞阵列式筛选芯片, 利用化学物质诱导乳腺癌细胞 MCF-7 细胞死亡的原理, 进行抗肿瘤药物的筛选。该装置较传统的高通量筛选更省时省力, 易于使用。Fukuda 等^[38]设计了一种具有球状细胞培养腔的细胞培养芯片, 将肝癌细胞固定于培养芯片上, 通过对肝癌细胞 P450 酶荧光分析, 筛选出适宜的药物抑制浓度。在活性成分筛选临床应用方面, Nason 等^[39]报道在微流控芯片上对体外细胞进行药物筛选用于骨质疏松的治疗。该芯片用于输送和混合化学样品的微通道网络被设计来提供每一个细胞的药物浓

度。Trna 课题组^[40]在微流控芯片上建立了一种通过检测血小板细胞中激动剂诱导钙通量的方式来筛选直接作用血小板的特异性药物。

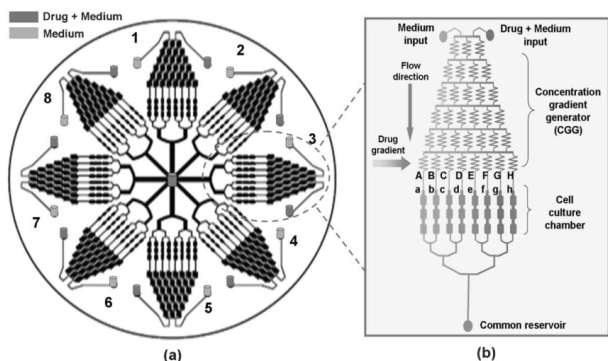


图4 Ye等构建的用于细胞水平药物筛选研究的集成化微流控芯片系统示意图

a-装置包含了8个相同的结构单元,且8个单元共用处于芯片中央的一个储液池;b-一个单元结构的放大图,包括上游的浓度梯度发生区(CGG)和下游平行的细胞培养腔。

Fig. 4 The integrated microfluidic chip system schematic for cell level drug screening Constructed by Ye et al

a-The device contains 8 identical structural units, and the 8 units is shared in a liquid storage pool at the center of the chip; b-A cell structure of the amplification map, including the upstream concentration gradient zone(CGG) and the downstream parallel cell culture chamber.

3.2 微流控芯片系统细胞水平药物毒性成分筛选

细胞毒性检测已成为新药开发过程中进行化合物筛选的主要观测指标,大量细胞培养微流控芯片药物毒性成分筛选方面的研究,对人们在药物的发现和研发的过程中尽早确定化合物的安全性与功效起到了积极的促进作用。

Bang等^[41]设计的微流控芯片装置可在芯片上配出不同药物浓度的溶剂,再引入到细胞培养池中进行细胞毒性实验。Wang等^[42]设计了多层次的 24×24 橡胶阵列式微流控高通量筛选芯片,培养并用荧光标记哺乳动物细胞,然后利用3种不同细胞(BALB/3T3 细胞、HeLa 细胞、牛内皮细胞)筛选了洋地黄皂苷、皂角苷、丙烯醛等毒性物质,在荧光显微镜下观察药物与细胞相互作用,测试了毒性物质对细胞的形态和生存能力的影响,实验提供了一种高密度平行的药物筛选方法。Sugiura等^[43]设计了具有 8×5 结构的阵列式细胞培养芯片(图5),该芯片采用独立的灌注通道、压力驱动及流体传输系统,使气泡容易排出,进样均匀,也使得每个细胞培养腔都有一个独立的灌注通道,避免了相邻通道之间的相互影响,使得平行试验的结果更加准确。通过对HeLa 细胞进行

荧光标记及细胞状态的显微观察,对卡铂、顺铂、阿波糖苷、阿霉素、依托泊苷、紫杉醇、他莫昔芬7种药物进行细胞毒性测试,成功观测到细胞对药物的反应。该装置的集成化与流动液体压力注入可以使其达到大规模高通量药物筛选。

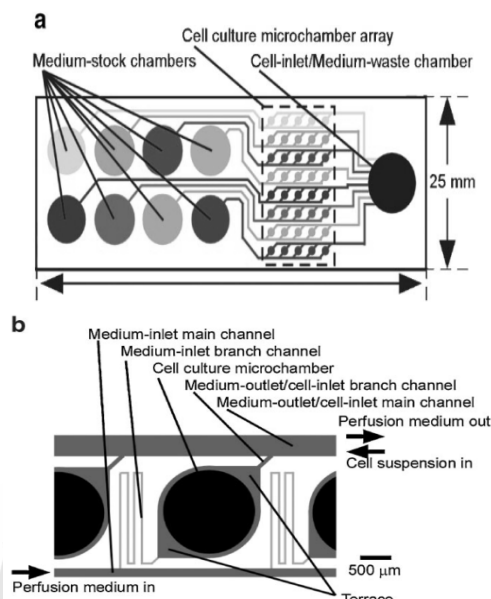


图5 灌注培养阵列式细胞培养芯片示意图

a-芯片整体结构示意图;b-单个细胞培养微腔的结构。

Fig. 5 Schematic diagram of the cell culture chip of the cell culture of perfusion flow

a-schematic diagram of chip integrated structure; b-structure of single cell culture cavity.

Toh等^[44]报道了一种基于三维肝细胞培养的体外毒性测试微流控芯片系统。在该设计中,芯片可保证肝细胞合成和代谢功能的微环境,还可同时多通道内释放线性浓度的药物来刺激肝细胞,从而预测体内药物肝毒性。

4 讨论

作为目前发展迅速的高新技术和多学科交叉研究前沿领域之一,微流控芯片分析系统的出现使实验室的微型化、集成化、自动化和便携化成为可能。目前,用于细胞培养、药物检测等的微流控芯片分析技术展现了巨大的发展潜力和应用价值,基于微流控芯片的细胞培养、分析和药物筛选,正逐步成为人们关注和研究的热点。微流控分析系统应用到细胞水平药物筛选领域,将有着无可限的发展空间。

然而,尽管在细胞操作分析方面与常规方法相比有很大优势,但是目前的微流控芯片技术仍然存在很多问题。近年来很多学者对微流控芯片

的各个功能单元做了比较深入的研究,取得了很多突破性的成果,然而许多现有的微流控细胞芯片还不能独立、系统地完成细胞操作与分析,其在整体上依然存在技术难度高、操作手段复杂、成本昂贵和对仪器设备要求高等缺点,作为药物筛选的实验平台还处于早期研究开发阶段,尚未达到理想的商品化和通用化程度。微流控芯片技术要真正成为新一代药物筛选平台还有很长的道路要走。

但不可否认的是,微流控技术正处于快速发展的过程中,40年前微电子技术在信息科学的发展中引发了一场革命,并对20世纪的科技发展起了重要的推动作用,而 μ TAS预计在未来也将对分析科学乃至整个科学技术的发展发挥相似的作用。笔者相信,随着微机电加工技术、显微荧光标记数码影像分析以及图像数据处理技术的快速发展,微流控芯片技术一定会得到进一步的完善和发展,其在细胞分析和药物筛选领域将占有举足轻重的作用,从根本上对新药研发流程中的各个主要技术环节进行革新,实现对整个新药研发体系某种程度上的升级,从而显著降低新药研发的周期和成本,加快新药研发步伐,对人类健康和社会发展产生深远的影响^[45]。

REFERENCES

- [1] HARRISON D J, MANZ A, FAN Z, et al. Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip [J]. *Anal Chem*, 1992, 64(17): 1926-1932.
- [2] WEIGL B H, BARDELL R L, CABRERA C R. Lab-on-a-chip for drug development [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(3): 349-377.
- [3] EL-ALI J, SORGER P K, JENSEN K F. Cells on chips [J]. *Nature*, 2006, 442(7101): 403-411.
- [4] YEO L Y, CHANG H C, CHAN P P, et al. Microfluidic devices for bioapplications [J]. *Small*, 2011, 7(1): 12-48.
- [5] CRAIGHEAD H. Future lab-on-a-chip technologies for interrogating individual molecules [J]. *Nature*, 2006, 442(7101): 387-393.
- [6] REGEHR K J, DOMENECH M, KOEPEL J T, et al. Biological implications of polydimethylsiloxane-based microfluidic cell culture [J]. *Lab Chip*, 2009, 9(15): 2132-2139.
- [7] YANG Y, KULANGARA K, SIA J, et al. Engineering of a microfluidic cell culture platform embedded with nanoscale features [J]. *Lab chip*, 2011, 11(9): 1638-1646.
- [8] LII J, HSU W J, PARSA H, et al. Real-time microfluidic system for studying mammalian cells in 3D microenvironments [J]. *Anal Chem*, 2008, 80(10): 3640-3647.
- [9] LIN Z, CHERNG-WEN T, ROY P, et al. In-situ measurement of cellular microenvironments in a microfluidic device [J]. *Lab Chip*, 2009, 9(2): 257-262.
- [10] LAM R H W, KIM M C, THORSEN T. Culturing aerobic and anaerobic bacteria and mammalian cells with a microfluidic differential oxygenator [J]. *Anal Chem*, 2009, 81(14): 5918-5924.
- [11] HEO Y S, CABRERA L M, SONG J W, et al. Characterization and resolution of evaporation-mediated osmolality shifts that constrain microfluidic cell culture in poly (dimethylsiloxane) devices [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(3): 1126-1134.
- [12] RANDALL G C, DOYLE P S. Permeation-driven flow in poly (dimethylsiloxane) microfluidic devices [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(31): 10813-10818.
- [13] CHEN H Y, MCCLELLAND A A, CHEN Z, et al. Solventless adhesive bonding using reactive polymer coatings [J]. *Anal Chem*, 2008, 80(11): 4119-4124.
- [14] LEE S, VÖRÖS J. An aqueous-based surface modification of poly(dimethylsiloxane) with poly (ethylene glycol) to prevent biofouling [J]. *Langmuir*, 2005, 21(25): 11957-11962.
- [15] GOMEZ-SJOBERG R, LEYRAT A A, HOUSEMAN B T, et al. Biocompatibility and reduced drug absorption of Sol-Gel-Treated poly (dimethyl siloxane) for microfluidic cell culture applications [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(21): 8954-8960.
- [16] KEENAN T M, FOLCH A. Biomolecular gradients in cell culture systems [J]. *Lab Chip*, 2007, 8(1): 34-57.
- [17] KIM D, LOKUTA M A, HUTTENLOCHER A, et al. Selective and tunable gradient device for cell culture and chemotaxis study [J]. *Lab Chip*, 2009, 9(12): 1797-1800.
- [18] HUNG P J, LEE P J, SABOUNCHI P, et al. A novel high aspect ratio microfluidic design to provide a stable and uniform microenvironment for cell growth in a high throughput mammalian cell culture array [J]. *Lab Chip*, 2005, 5(1): 44-48.
- [19] JEON N L, DERTINGER S K W, CHIU D T, et al. Generation of solution and surface gradients using microfluidic systems [J]. *Langmuir*, 2000, 16(22): 8311-8316.
- [20] DERTINGER S K W, CHIU D T, JEON N L, et al. Generation of gradients having complex shapes using microfluidic networks [J]. *Anal Chem*, 2001, 73(6): 1240-1246.
- [21] SONG J W, CAVNAR S P, WALKER A C, et al. Microfluidic endothelium for studying the intravascular adhesion of metastatic breast cancer cells [J]. *PloS One*, 2009, 4(6): e5756. Doi: 10.1371/journal.pone.0005756.
- [22] HUANG Y Z, FANG Q, LI D N. A flow analysis system based on microfluidic chip with continuous sample introduction and gravity-driven flows [J]. *Chem J Chin Univ (高等学校化学学报)*, 2004, 25(9): 1628-1631.
- [23] GROVER W H, SKELLEY A M, LIU C N, et al. Monolithic membrane valves and diaphragm pumps for practical large-scale integration into glass microfluidic devices [J]. *Sens Actuators B Chem*, 2003, 89(3): 315-323.
- [24] QIN J H, LIU T J, LIN B C. Cell laboratory on a microfluidic chip [J]. *Chinese J Chromatog (色谱)*, 2009, 27(5): 655-661.
- [25] GAO D, LIU J, WEI H B, et al. A microfluidic approach for anticancer drug analysis based on hydrogel encapsulated tumor cells [J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 665(1): 7-14.
- [26] ZHU Z, FREY O, OTTOZ D S, et al. Microfluidic single-cell cultivation chip with controllable immobilization and selective release of yeast cells [J]. *Lab Chip*, 2012, 12(5): 906-915.
- [27] SRIGUNAPALAN S, EYDELNANT I A, SIMMONS C A, et al. A digital microfluidic platform for primary cell culture and analysis [J]. *Lab Chip*, 2012, 12(2): 369-375.
- [28] FORRY S P, LOCASCIO L E. On-chip CO₂ control for

- microfluidic cell culture [J]. Lab Chip, 2011, 11(23): 4041-4046.
- [29] YANG C B, CHEN Q, SHAO J B, et al. Study on glass cell culture chips [J]. Lett Biotech(生物技术通讯), 2008, 19(1): 76-79.
- [30] CHEN L, LEE S, CHOO J, et al. Continuous dynamic flow micropumps for microfluid manipulation [J]. J Micromech Microeng, 2008, 18(1): 013001. Doi: 10.1088/0960-1317/18/1/013001
- [31] HUNG P J, LEE P J, SABOUNCHI P, et al. Continuous perfusion microfluidic cell culture array for high-throughput cell-based assays [J]. Biotechnol Bioeng, 2005, 89(1): 1-8.
- [32] WELTIN A, SLOTWINSKI K, KIENINGER J, et al. Cell culture monitoring for drug screening and cancer research: a transparent, microfluidic, multi-sensor microsystem [J]. Lab Chip, 2014, 14(1), 138-146.
- [33] WANG L H, LIU D Y, WANG B, et al. Design of parallel microfluidic gradient-generating networks for studying cellular response to chemical stimulus [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2008, 36(2): 143-149.
- [34] TSUI J H, LEE W, PUN S H, et al. Microfluidics-assisted *in vitro* drug screening and carrier production [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2013, 65(11/12): 1575-1588.
- [35] YE N N, QIN J H, SHI W W, et al. Cell-based high content screening using an integrated microfluidic device [J]. Lab Chip, 2007, 7(12): 1696-1704.
- [36] WU J H, WHEELDON I, GUO Y Q, et al. A sandwiched microarray platform for benchtop cell-based high throughput screening [J]. Biomaterials, 2011, 32(3): 841-848.
- [37] KWON C H, WHEELDON I, KACHOUIE N N, et al. Drug-eluting microarrays for cell-based screening of chemical-induced apoptosis [J]. Anal Chem, 2011, 83(11): 4118-4125.
- [38] FUKUDA J, NAKAZAWA K. Hepatocyte spheroid arrays inside microwells connected with microchannels [J]. Biomicrofluidics, 2011, 5(2): 022205. Doi: 10.1063/1.3576905
- [39] NASON F, MORGANTI E, COLLINI C, et al. Design of microfluidic devices for drug screening on in-vitro cells for osteoporosis therapies [J]. Microelectronic Eng, 2011, 88(8): 1801-1806.
- [40] TRAN L, FARINAS J, RUSLIM-LITRUS L, et al. Agonist-induced calcium response in single human platelets assayed in a microfluidic device [J]. Anal Biochem, 2005, 341(2): 361-368.
- [41] BANG H, LIM S H, LEE Y K, et al. Serial dilution microchip for cytotoxicity test [J]. J Micromech Microeng, 2004, 14(8): 2004, 14(8): 1165-1170.
- [42] WANG Z, KIM M C, MARQUEZ M, et al. High-density microfluidic arrays for cell cytotoxicity analysis [J]. Lab Chip, 2007, 7(6): 740-745.
- [43] SUGIURA S, EDAHIRO J, KIKUCHI K, et al. Pressure-driven perfusion culture microchamber array for a parallel drug cytotoxicity assay [J]. Biotechnol Bioeng, 2008, 100(6): 1156-1165.
- [44] TOH Y C, LIM T C, TAI D, et al. A microfluidic 3D hepatocyte chip for drug toxicity testing [J]. Lab Chip, 2009, 9(14): 2026-2035.
- [45] TSUI J H, LEE W, PUN S H, et al. Microfluidics-assisted *in vitro* drug screening and carrier production [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2013, 65(11/12): 1575-1588.

收稿日期: 2015-05-07

环氧酮肽类蛋白酶体抑制剂的研究进展

孔丽敏, 孙浩珍, 张幸国(浙江大学附属第一医院药剂科, 杭州 310003)

摘要: 随着硼替佐米和卡非佐米被 FDA 批准用于多发性骨髓瘤患者的治疗, 蛋白酶体已成为一种越来越热门的抗肿瘤药物的靶点。环氧酮肽类化合物由于其良好的选择性和较低的不良反应已成为蛋白酶体抑制剂的研究热点。本文主要综述蛋白酶体的结构和功能、环氧酮肽类蛋白酶体抑制剂的作用机制及发展现状。

关键词: 蛋白酶体抑制剂; 环氧酮肽类化合物; 卡非佐米; ONX-0912

中图分类号: R963 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2015)12-1525-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.12.028

Research Progress of Epoxyketone Peptidyl Proteasome Inhibitors

KONG Limin, SUN Haozhen, ZHANG Xingguo(Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital, Zhejiang University, 310003, China)

ABSTRACT: The approval of proteasome inhibitors-bortezomib and carfilzomib for the treatment of multiple myeloma by FDA validates the potential of proteasome as a promising anti-cancer drug target. Due to the better selectivity and fewer side effects of epoxyketone peptidyl proteasome inhibitors, they have attracted increasing attentions. The structure and function of proteasome

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目(2014KYA074)

作者简介: 孔丽敏, 女, 硕士, 药师 Tel: (0571)87236535 E-mail: liminkn@163.com