基于微流控芯片构建三维基质支架中的肿瘤细胞侵袭模型

宋振, 蔡绍哲*, 陈斯佳, 晏小清, 孙炜, 卢斯媛

重庆大学生物工程学院, 生物流变科学与技术教育部重点实验室, 重庆 400044

* 联系人, E-mail: sxcai@cqu.edu.cn

2012-01-10 收稿, 2012-05-21 接受

国家自然科学基金(11172339)、“211 工程”三期建设(S-09104)和重庆大学大型仪器设备开放基金资助

摘要 肿瘤细胞侵袭是一个复杂而高度协调的过程, 传统的实验技术, 如 Boyden 小室、Transwell 小室法大多只能在二维(2D)尺度下研究肿瘤细胞侵袭, 并不能反映体内的侵袭微环境以及监测侵袭过程. 为得到更为真实可信的侵袭结果, 在体外构建一种三维(3D)肿瘤细胞侵袭模型是十分必要的. 本研究在微流控技术基础上自行设计和构建肿瘤细胞侵袭模型, 该模型不仅能够模拟肿瘤细胞的侵袭 3D 微环境, 而且能够监测肿瘤细胞与 3D 微环境的相互作用, 以及全程监测生化因子对肿瘤细胞侵袭过程的动态影响. 为评价该芯片用于研究肿瘤细胞侵袭机制的可行性和优越性, 用该芯片模拟乳腺肿瘤细胞(MDA-MB-231)的 3D 微环境, 并全程监测在细胞坏死因子(TNF- α)浓度梯度诱导下, MDA-MB-231 侵袭的全过程. 该模型实验结果表明, TNF- α 能够诱导 MDA-MB-231 在 3D 基质胶中进行定向侵袭, 并且发现侵袭到基质胶中的 MDA-MB-231 会形成具有侵袭突起的顶细胞, 顶细胞和柄细胞首尾相连形成线状. 该微流控芯片有望为研究肿瘤细胞的侵袭机制和开发抑制肿瘤细胞侵袭药物提供一个新的研究平台.

关键词

微流控芯片
3D
侵袭
肿瘤坏死因子

肿瘤细胞侵袭是一个多步骤且高度协调的过程, 这一过程主要包括形成具有侵袭突起的顶细胞、基质降解和细胞侵袭^[1,2]. 在肿瘤细胞侵袭过程中, 肿瘤细胞分泌基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)降解基质胶(胞外基质)是肿瘤细胞进行侵袭的关键步骤之一. 细胞坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)能够诱导乳腺肿瘤细胞(MDA-MB-231)分泌 MMP9, 从而提高肿瘤发生^[3]. 传统的实验技术, 如 Boyden 小室、Transwell 小室法只能在二维(2D)培养条件下通过染色的方法得到肿瘤细胞迁移或侵袭结果, 不能简便地监测肿瘤细胞侵袭或迁移的整个过程, 并且无法模拟肿瘤细胞的三维(3D)微环境, 而体内的 3D 基质微环境对肿瘤细胞的信号通路和特定细胞生物行为有着重要的意义^[1,4]. 因此, 在体外构建、

模拟更加接近体内真实的 3D 基质微环境, 将有利于研究人员更加深入研究肿瘤细胞侵袭机制.

随着微流控技术的发展, 微流控技术与传统的生物学技术相结合, 能够在体外模拟体内微环境^[5]. 微流控系统的主要优势: 由于芯片的通道只有微米级别, 所以需要的试剂和细胞量极小; 此外, 由于芯片能够与外围设备如电子显微镜和荧光分析仪等仪器连接, 可以实时监控和监测细胞动态变化. 近年, 学者们把微流控技术应用于研究肿瘤细胞运动机制, 已经取得一些新的研究成果. Breckenridge 等人^[6]用光刻技术设计和构造由 2 条主要通道构成的微流控装置, 用于研究趋化因子浓度梯度下 MDA-MB-231 在不同孔道中形态变化和迁移速度. 研究表明 II 型肌球蛋白(NM-II)对 MDA-MB-231 在不同孔道的迁

英文引用格式: Song Z, Cai S X, Chen S J, et al. A novel cancer invasion model based on a microfluidic device in a 3-dimensional matrix (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2012, 57: 2184–2191, doi: 10.1360/972011-2551

移速度有明显促进作用. 但是, MDA-MB-231 在孔道中的迁移是在 2D 尺度下进行, 不能够反映肿瘤细胞侵袭的 3D 微环境. Liu 等人^[7]用一种微流控装置实现肿瘤相关成纤维细胞(cancer associated fibroblasts, CAFs) 和涎腺腺样囊性肿瘤(salivary gland adenoid cystic carcinoma, ACC)细胞在 3D 条件下的共培养. 研究表明, 在 3D 条件下 CAFs 能够促进 ACC 形成肿瘤球体, 并诱导 ACC 球体向 CAFs 方向迁移. 该研究虽然在 3D 条件下验证 CAFs 能够提高 ACC 侵袭, 但是并没有考察在 3D 条件下单一生化因子对肿瘤细胞侵袭的影响. Abhyankar 等人^[8]设计和构建只有 1 条主通道的微流控芯片, 研究内皮生长因子(EGF)在 3D 环境下诱导转移性大鼠乳腺癌细胞(metastatic rat mammary adenocarcinoma cells, MTLn3)迁移. 24 和 48 h 研究表明, EGF 能够诱导 MTLn3 在 3D 基质胶中进行侵袭, 但是侵袭的过程和结果需要通过染色的方法进行描述和统计, 不能简便监测肿瘤细胞侵袭的全过程, 并且不能对侵袭结果实现不同角度的量化处理. 此外, 该研究没有考察在生化因子诱导肿瘤细胞发生定向侵袭过程中, 肿瘤细胞之间、肿瘤细胞与胞外基质之间的相互作用对肿瘤细胞侵袭的影响.

本研究利用自行设计和构建的肿瘤细胞侵袭模型模拟肿瘤细胞在体内侵袭的 3D 微环境, 并对肿瘤细胞 3D 微环境的生化因素进行调控, 实时监测生化因子对肿瘤细胞侵袭的动态影响, 并且对侵袭结果进行不同角度的量化处理. 本研究对所用微流控芯片的构造进行最大程度的优化, 不仅使凝胶通道灌注基质胶, 用于模拟肿瘤细胞 3D 微环境简单易行, 而且增加了微通道的尺度, 更有利于在肿瘤细胞侵袭过程中监测肿瘤细胞之间的相互作用以及在侵袭过程中肿瘤细胞的形态变化. 为了便于监测肿瘤细胞对生化因子浓度梯度的响应, 本研究所用微流控芯片的微通道呈菱形结构, 这一设计有利于监测癌细胞侵袭的方向性. 以上特点可能为研究肿瘤细胞多步骤而高度协调的侵袭机制, 提供一个比较理想的肿瘤细胞侵袭模型. 为评估该模型的可行性和优越性, 本研究用 FITC-葡聚糖的扩散实验表征微流控芯片中 3D 基质胶的浓度梯度. 为验证微流控芯片是否能够进行细胞培养, 对微流控芯片的细胞进行双染实验. 最后通过 TNF- α 浓度梯度诱导 MDA-MB-231 进行 3D 基质胶侵袭实验, 监测肿瘤细胞侵

袭过程中形态变化和彼此之间的相互作用.

1 材料与方法

1.1 材料

(i) 生物学实验材料. MDA-MB-231 由第三军医大学组织与胚胎学教研室馈赠. 基质胶购于美国 BD 公司生产的 matrigelTM 基质基底膜. 分子量 15 kD 的 FITC-葡聚糖购于美国 Invitrogen 公司. 钙黄绿素和碘化丙啶(PI)购于美国 Molecular Probes 公司. DMEM 和胎牛血清购于德国 Hyclone 公司. TNF- α 购于中国欣百诺生物有限公司.

(ii) 其他材料. Sylgard184 型聚二甲基硅氧烷(PDMS)预聚体及固化剂购于美国 Dow Corning 公司. SU-8 购于美国 Microchem 公司. CCD 为日本 Tokyo 公司 Olympus DP25 型号.

1.2 方法

(i) 微流控芯片的设计与构造. 该微流控芯片主要由 3 个平行通道构成, 平行通道之间由呈菱形的微通道连接(图 1(a)). 两边的通道长、宽、高分别为 1600, 500 和 250 μm ; 中间通道长、宽、高分别为 2000, 400 和 250 μm ; 连通平行通道的微通道宽度为 250 μm , 高度为 250 μm , 呈菱形, 其中锐角为 60°. 通道的制作过程: 首先在玻璃片上制作带有微通道图样的 SU-8 负性光刻胶阳模, 通道图案的厚度为 250 μm , 将 PDMS 预聚体与凝固剂按 10:1 比例充分混合, 制成 PDMS 预凝剂, 用真空泵抽气 30 min. 将 PDMS 预聚体倒在硅阳模上, 放到 80°C 的恒温箱中 1.5 h 使其固化. 将凝固的 PDMS 基片与硅阳模分离, PDMS 基片用磨平的 20 mL 注射器针头打孔, 然后将 PDMS 基片与玻璃片放在氧离子机中处理 60 s, 把 PDMS 基片与玻璃片键合形成密闭芯片, 然后将芯片放在 120°C 加热器上加热 30 min, 最后将芯片 121°C 30 min 高温高压灭菌.

(ii) 细胞与基质胶混合液的灌注. 本研究所用细胞为人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231. MDA-MB-231 用 DMEM 培养, 使用前加入胎牛血清至终浓度为 10%, 100 U/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素, 置于含 5% CO₂, 37°C 恒温培养箱中. 细胞生长至对数生长期, 用 0.25% 胰酶消化离心制成悬浮液, 细胞悬浮液最终浓度为 10⁶ 个/mL. 为了使基质胶溶解, 把基

图1 微流控芯片构型

(a) 微流控芯片的构造, 主要由 3 个互相平行的主通道构成, 其中间有菱形通道连通 3 条相互平行的通道; (b) 微流控芯片实物图, 中间灌注含有红墨水的基质胶, 两边分别灌注含有蓝墨水和荧光素的 PBS; (c) 微流控芯片三维细胞培养模型图, 中间灌注含有 MDA-MB-231 的基质胶, 两边灌注含有血清的培养基; (d) 微流控芯片细胞侵袭模型图, 下通道灌注 MDA-MB-231, 中间通道灌注基质胶, 上通道灌注含有或者不含有 TNF- α 的细胞培养液. 其中下通道中有黏附在基质胶上的 MDA-MB-231, 而且通道内还有少量未被冲走的 MDA-MB-231

质胶放在盛有冰的容器中, 然后放在 4℃ 冰箱中过夜. 在冰上把基质胶与细胞悬浮液按 1:1 混合均匀, 用预冷枪头各吸取 10 μL 细胞悬液和基质胶, 并在冰上将其充分混合, 然后灌注到芯片中间通道. 将灌注好的芯片放在 37℃ 细菌培养箱中 15 min. 当基质胶凝固以后, 吸取 40 μL 培养液分别滴在两边通道的入口处, 然后再分别从通道的另一边出口处轻轻吸, 使培养液充满两边通道.

(iii) 基质胶中可溶性因子浓度梯度的形成及表征分析. 本研究用与 TNF- α 蛋白分子量相等的 FITC-葡聚糖来验证生化因子通过基质胶能形成稳定的浓度梯度, 其中 FITC-葡聚糖浓度与实验组 TNF- α 浓度相一致, 且浓度均为 10 ng/mL, 通过分析荧光强度的分布来考察 TNF- α 浓度梯度的分布情况. 主要步骤如下: 当基质胶在中间通道凝固以后, 在两边通道灌注 PBS 后把芯片放在 37℃ 细胞培养

箱中 2 h. 用 100 μL 枪头吸取含有 FITC-葡聚糖的 PBS, 分别插在一边通道的出口和入口处, 吸取不含有 FITC-葡聚糖的 PBS, 分别插在另外一边通道的出口和入口处. 本研究用安装 CCD 的荧光倒置显微镜观察中间通道基质胶中 FITC-葡聚糖形成的浓度梯度. FITC-葡聚糖在静止状态下, 通过微通道从一边通道扩散到中间通道时记录 $t=0$, 倒置荧光显微镜从 $t=0$ 开始计时, 每隔 5 min 拍 1 张图像, 共观察 10 h. 本研究用 MATLAB 将所得荧光图片进行灰度处理, 在 MATLAB 中设置所有帧图片中, 荧光源通道的荧光强度为 1. 在所有帧图像中选取相同区域进行归一化处理, 把所选区域离荧光源最远的像素点设置为 1, 以距离为横坐标、荧光强度为纵坐标, 绘制荧光强度分布曲线.

(iv) MDA-MB-231 在基质胶中的活性分析. 将灌注好 MDA-MB-231 的芯片放在 37℃ 细胞培养箱

中培养 3 d, 用浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 钙黄绿素 AM 和 2 $\mu\text{mol/L}$ PI 灌注到两边通道中进行双染, 把芯片放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中 40 min. 然后芯片两边通道用 PBS 冲洗 2~3 次, 用倒置荧光显微镜检验 MDA-MB-231 活性.

(v) MDA-MB-231 的侵袭分析. 在冰上把基质胶灌注到芯片中间通道, 然后把芯片放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中 15 min. 用 0.25% 胰酶消化离心, 制成最终浓度为 10^6 个/mL 细胞悬浮液. 吸取细胞悬浮液 40 μL 滴在一边通道的入口处, 然后从出口处轻轻吸, 使细胞悬浮液灌满整个通道, 另外一个通道灌注无血清培养基. 把灌注好的芯片放在一次性培养皿中, 然后把一次性培养皿放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱 30 min. 为了悬浮细胞黏附于基质胶上, 把灌有细胞的通道垂直向上. 当黏附完成后, 用无血清培养基冲走没有黏附的细胞, 两边通道更换无血清培养基, 放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中饥饿 4 h. 向含有细胞的通道内灌注无血清培养基, 向另一通道灌注含有 TNF- α 培养基. 为了维持浓度梯度稳定性, 每隔 8 h 换一次液, 用相差显微镜每隔 12 h 记录一次侵袭结果. 用 ImageJ 计算细胞的最大侵袭距离和侵袭到基质胶中的细胞面积, 定量分析 MDA-MB-231 在 TNF- α 浓度梯度诱导下的侵袭能力.

(vi) 实验结果统计分析. 所有实验数据用平均数 $\pm$ 标准差 ($n \geq 3$) 表示, 应用 SPSS 18.0 软件包对实验数据进行统计分析, 采用 t 检验进行组间差异比较分析, 当 $P < 0.05$ 时, 认为 2 组之间差异显著.

2 结果与讨论

2.1 微流控的设计与构造

如图 1 所示, 该微流控芯片包含 3 个平行的通道, 中间通道灌注基质胶, 用于模拟细胞在体内 3D 微环境. 微通道是呈 60 $^{\circ}$ 锐角的菱形, 这一构造不仅可以连通主通道, 而且还可以使 TNF- α 在基质胶中形成浓度梯度具有一定的方向性, 有利于监测肿瘤细胞在 TNF- α 诱导下侵袭的方向性. 通道宽度和微通道长度的比例, 可以使 10 μL 枪头完成灌注基质胶到中间通道的过程, 并能使灌注到通道的基质胶充满整个通道, 而不发生基质胶外溢到两边通道的现象. 芯片的厚度已经达到光刻技术的极限, 这一设计能够使细胞黏附于基质胶的细胞面达到最大, 有利于监测肿瘤细胞与肿瘤细胞之间、肿瘤细胞与胞外基质之间的相互作用.

2.2 基质胶的浓度梯度

本研究用荧光强度来表示生化因子通过基质胶形成的浓度梯度. 如图 2(a) 所示, FITC-葡聚糖从上边通道经过中间基质胶通道扩散到下边通道, 在中间通道的基质胶中, 荧光强度会随着时间递增而逐渐增强, 最后形成浓度梯度. 本研究把画虚线的区域标准化后进行荧光强度测量. 如图 2(b) 所示, 中间基质胶的荧光曲线随着梯度的形成而绘制出来, 经过 90 min 后, 长为 400 μm 的虚线区域形成类似于直线的浓度曲线, 并且类似于直线的曲线将维持 10 h. 但是

图 2 用荧光强度来表征基质胶通道的荧光梯度

(a) 当基质胶在中间通道凝固以后, 在上通道和下通道中分别注入含有荧光素葡聚糖 PBS 和 PBS, 基质胶的纵向长度为 900 μm . 虚线部分表示荧光强度的测量部分; (b) 在 90 min 时形成稳定的浓度梯度, 浓度梯度能够保持 600 min

随着扩散的进行,上通道的 FITC-葡聚糖将慢慢扩散到下通道,随着时间的推移在中间的基质胶中, FITC-葡聚糖浓度将达到平衡状态,最终会导致浓度梯度消失.

在肿瘤转移、血管发生和伤口愈合等生理过程中,生化因子的浓度梯度起着重要的作用^[9,10]. 传统的体外实验研究表明生化因子浓度梯度对癌症转移具有一定影响,但是传统的实验方法不能够实时监测肿瘤细胞在浓度梯度下运动的全过程,并且不能人为地控制稳定浓度梯度形成. 传统实验方法,如 Boyden 小室无法营造肿瘤细胞的 3D 环境并维持稳定的浓度梯度,从而不能对肿瘤细胞定向侵袭机制进行深入的研究. 本研究所用微流控芯片能够使 TNF- α 在基质胶中形成稳定浓度梯度,并实时监测在 TNF- α 诱导 MDA-MB-231 时,在稳定浓度梯度下侵袭全过程,包括 MDA-MB-231 侵袭位置和在 3D 微环境中肿瘤细胞侵袭的形态变化.

2.3 基质胶中的 MDA-MB-231 形态与活性

MDA-MB-231 在微流控芯片中进行 2D 和 3D 条件培养,用以验证微流控芯片适合进行细胞培养. 从图 3(a)和(b)中可以观察,微流控芯片培养 72 h 后 MDA-MB-231 在 2D 和 3D 的形态. 在 2D 条件下,MDA-MB-231 细胞呈平铺状态. 在 3D 基质胶中,MDA-MB-231 细胞处在基质胶的包裹中而呈圆球形,在培养一段时间后,肿瘤细胞出现聚集现象. 为了检验 MDA-MB-231 在基质胶中的活性,在微流控芯片中,用钙黄绿素 AM 和 PI 对培养 72 h 之后的 MDA-MB-231 进行双染,其中钙黄绿素 AM 用来检验细胞的存活,PI 用来检测凋亡细胞. 从图 2(b)可以看到有高于 95% 的活细胞,其中少量凋亡细胞是由于在操

作过程中把细胞与冷基质胶混合所致^[12]. 实验结果表明,MDA-MB-231 能够用微流控芯片进行培养.

2.4 肿瘤坏死因子诱导 MDA-MB-231 细胞在基质胶中的侵袭

从图 4(A(a)~(d))可以观察到, TNF- α 可以诱导 MDA-MB-231 逐渐从浓度低的区域侵袭到浓度高的区域. 在侵袭过程中,首先少量 MDA-MB-231 会侵袭到基质胶中而形成具有侵袭突起的顶细胞,后侵入基质胶的 MDA-MB-231 会尾随顶细胞,在基质胶中形成线状,从生化因子浓度低区域侵袭到生化因子浓度高区域(图 4B(e)). 从图 4(B(b)和(e))中可以观察到,在下游微通道两侧,MDA-MB-231 顺 TNF- α 浓度梯度大于逆 TNF- α 浓度梯度的侵袭程度,更加说明了 TNF- α 能够诱导 MDA-MB-231 在 3D 基质胶中定向侵袭. 本研究用侵袭的距离和面积衡量 MDA-MB-231 的侵袭效果,发现 TNF- α 诱导 MDA-MB-231 侵袭的距离和面积显著增加.

肿瘤细胞侵袭是一种复杂而高度协调的过程,而肿瘤细胞所处的微环境对肿瘤细胞侵袭起着重要的作用^[1]. 在肿瘤微环境中,肿瘤相关巨噬细胞能够分泌 TNF- α , TNF- α 能够诱导 MDA-MB-231 分泌 MMP9, MMP9 能够降解基质促进肿瘤细胞的运动^[3]. TNF- α 还能够提高整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的表达量,从而增加软骨瘤细胞的迁移能力^[11]. 但是这些研究所用的传统体外方法不能监测肿瘤细胞侵袭过程中,侵袭到基质胶中的 MDA-MB-231 形成具有侵袭突起的顶细胞,并且顶细胞和柄细胞首尾相连形成线状. 肿瘤细胞形成线状在基质胶中进行侵袭,可能是肿瘤细胞之间、肿瘤细胞与胞外基质之间的相互作用的结果. 有研究表明,肿瘤细胞易于向血管方向发生侵袭^[12],

图 3 MDA-MB-231 在微流控芯片中用钙黄绿素 AM 和 PI 染色的活性表征

(a) MDA-MB-231 在主通道中培养 72 h, 绝大多数细胞生长状态良好; (b) MDA-MB-231 与基质胶混匀注入中间通道, 在基质胶通道培养 72 h, 有 95% 的细胞生长状态良好, 并且细胞不同于 2D 培养条件下的形态, 在 3D 基质胶下 MDA-MB-231 细胞呈圆形且有一定聚集现象. 标尺大小为 100 μm

图4 在TNF-α的浓度梯度下MDA-MB-231在3D基质胶的侵袭

(A) 侵袭的对照实验; (B(a)~(d)) MDA-MB-231在48h的侵袭过程; (B(e)) 在24h时, MDA-MB-231侵袭到基质胶中所形成具有侵袭突起的顶细胞, 箭头所指是顶细胞和柄细胞连接形成的线状(标尺示100 μm); (B(f),(g)) MDA-MB-231在基质胶中侵袭程度分析. 在TNF-α的诱导下, MDA-MB-231在3D基质胶中的侵袭面积和距离有明显增加. $n=6$, $*P < 0.05$

在侵袭过程中肿瘤细胞微环境中肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF)和EGF含量会上调^[13], 肿瘤细胞可能为接收所处微环境变化发生定向侵袭, 而形成具有侵袭突起的顶细胞. TNF-α能诱导MDA-MB-231分泌MMP9降解胞外基质, 侵入基质胶的顶细胞降解基质胶形成孔道, TNF-α通过Snail通路使

肿瘤细胞分泌E钙粘素^[14-16]. Wolf等人^[17]的研究表明TNF-α能够诱导MDA-MB-231分泌整合素蛋白, 在形成孔道中, 肿瘤细胞与基质胶中的整合素蛋白和钙粘素等细胞黏附分子(CAM)相互作用而形成线状, 但是顶细胞与基质和生化因子之间的机制至今尚不明确. 本研究所用的微流控芯片能够在体外模

拟侵袭的过程, 实时监测肿瘤细胞所形成具有侵袭突起的顶细胞对整个侵袭过程的作用, 并动态监测 3D 环境中生化因子对顶细胞侵袭的影响. 因此本研究所用的微流控芯片能为研究肿瘤细胞侵袭机制提供一个有用的研究模型.

3 结论

本研究用一种新型微流控芯片构建 3D 肿瘤细胞侵袭模型, 而传统的体外肿瘤细胞侵袭模型只能通过染色得到结果数据, 无法模拟肿瘤细胞的 3D 微环境, 不能监测肿瘤细胞侵袭或迁移的整个过程. 与传统模型相比, 该微流控芯片不仅能够模拟肿瘤细胞侵袭的 3D 微环境, 而且还能对肿瘤细胞 3D 微环境

的生化因素进行调控, 并实时监测生化因子对肿瘤细胞侵袭的动态影响. 本研究所用的芯片不仅能够得到更为真实可信的侵袭结果, 而且能监测肿瘤细胞在侵袭过程中的相互作用和形态变化. 本研究结果表明, 在 3D 基质胶中 TNF- α 能够提高 MDA-MB-231 的侵袭能力, 并且能够定向诱导 MDA-MB-231 从 TNF- α 浓度低区域向浓度高区域侵袭. 本研究发现侵袭到基质胶中的 MDA-MB-231 会形成具有侵袭突起的顶细胞并且彼此首尾相连形成线状. 以上研究结果表明, 本研究构建的微流控芯片能够为研究肿瘤细胞的侵袭机制提供一个更加准确可控的研究平台, 并有望为以后研发抗肿瘤侵袭药物提供新的筛选平台.

参考文献

- 1 Sahai E. Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr Opin Genet Devel*, 2005, 15: 87–96
- 2 Liu T J, Li C Y, Li H J, et al. A microfluidic device for characterizing the invasion of cancer cells in 3-D matrix. *Electrophoresis*, 2009, 30: 4285–4291
- 3 Kim S, Choi J H, Bin Kim J, et al. Berberine suppresses TNF- α -induced MMP-9 and cell invasion through inhibition of AP-1 activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Molecules*, 2008, 13: 2975–2985
- 4 Ridley A J, Schwartz M A, Burridge K, et al. Cell migration: Integrating signals from front to back. *Science*, 2003, 302: 1704–1709
- 5 Dai X Z, Cai S X, Ye Q F, et al. A novel *in vitro* angiogenesis model based on a microfluidic device. *Chin Sci Bull*, 2011, 56: 3301–3309
- 6 Breckenridge M T, Egelhoff T T, Baskaran H. A microfluidic imaging chamber for the direct observation of chemotactic transmigration. *Biomed Microdevices*, 2010, 12: 543–553
- 7 Liu T, Lin B, Qin J. Carcinoma-associated fibroblasts promoted tumor spheroid invasion on a microfluidic 3D co-culture device. *Lab Chip*, 2010, 10: 1671–1677
- 8 Abhyankar V V, Toepke M W, Cortesio C L, et al. A platform for assessing chemotactic migration within a spatiotemporally defined 3D microenvironment. *Lab Chip*, 2008, 8: 1507–1515
- 9 Keenan T M, Folch A. Biomolecular gradients in cell culture systems. *Lab Chip*, 2008, 8: 34–57
- 10 Chung B G, Choo J. Microfluidic gradient platforms for controlling cellular behavior. *Electrophoresis*, 2010, 31: 3014–3027
- 11 Hou C H, Yang R S, Hou S M, et al. TNF- α increases α v β 3 integrin expression and migration in human chondrosarcoma cells. *J Cell Physiol*, 2011, 226: 792–799
- 12 Wyckoff J B, Jones J G, Condeelis J S, et al. A critical step in metastasis: *In vivo* analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer Res*, 2000, 60: 2504–2511
- 13 Klein C A, Blankenstein T J F, Schmidt-Kittler O, et al. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet*, 2002, 360: 683–689
- 14 Wu Y, Deng J, Rychahou P G, et al. Stabilization of snail by NF- κ B is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell*, 2009, 15: 416–428
- 15 Wu Y, Zhou B P. TNF- α /NF- κ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer*, 2010, 102: 639–644
- 16 Sehrawat A, Singh S V. Benzyl isothiocyanate inhibits epithelial-mesenchymal transition in cultured and xenografted human breast cancer cells. *Cancer Pre Res*, 2011, 4: 1107–1117
- 17 Wolf K, Friedl P. Molecular mechanisms of cancer cell invasion and plasticity. *Br J Dermatol*, 2006, 154: 11–15

A novel cancer invasion model based on a microfluidic device in a 3-dimensional matrix

SONG Zhen, CAI ShaoXi, CHEN SiJia, YAN XiaoQing, SUN Wei & LU SiYuan

Key Laboratory of Biorheological Science and Technology (Ministry of Education), Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China

Cancer-cell invasion is a complex and highly coordinated process. Traditional experimental methods involving Boyden and transwell chamber models are suitable for counting the numbers of cancer cells invading through the base membrane in 2-dimensional culture, but are unable to mimic the extracellular matrix or monitor the live process of cancer-cell invasion. To obtain a more authentic representation of cancer-cell invasion, we therefore created a novel *in vitro* invasion model. In contrast to traditional methods, this model was better able to simulate the extracellular matrix, track the process of cancer cell invasion, and observe the tumor cell-extracellular matrix interactions. We evaluated the potential of this microfluidic device for investigating the mechanism of cancer-cell invasion by mimicking the extracellular matrix of MDA-MB-231 cells and monitoring MDA-MB-231 cell invasion in a stable concentration gradient of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in a 3-dimensional extracellular matrix. Our results showed that cancer cells responded to TNF- α stimulation by forming cellular protrusions and migrating towards high TNF- α concentrations. MDA-MB-231 cells connected with each other in a linear manner in the 3-dimensional extracellular matrix. These observations suggest that this microfluidic device represents a useful platform for elucidating the mechanisms of cancer invasion and for screening anti-invasion drugs for cancer therapy.

microfluidic device, 3-dimensional, invasion, TNF- α

doi: 10.1360/972011-2551