多功能复合的人工肾微芯片的制备及功能评估

朱文*, 李继伟, 崇保和, 杨学兵

华中科技大学材料科学与工程学院, 材料成形与模具技术国家重点实验室, 武汉 430074

* 联系人, E-mail: wennar@hust.edu.cn

2013-12-03 收稿, 2014-01-03 接受, 2014-05-16 网络版发表

国家自然科学基金(21173090, 30970717)和深圳市战略性新兴产业发展专项资金(JCYJ20120618100557119)资助

摘要 采用微流道技术加工出高度平行的微流道阵列芯片, 并结合细胞工程的方法, 制备出同时具有肾小球过滤和肾小管生理功能的人工肾微芯片透析装置. 将人肾近曲小管上皮细胞(HK-2)和人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)分别种植在透析膜材料上, 并与微流道阵列芯片组装成多层生物芯片人工肾微透析装置; 分别对组装的两层生物芯片微透析装置和六层生物芯片微透析装置进行了功能评估对比. 结果表明, 六层芯片微透析器具有很好的清除功能, 其中种植了细胞的聚醚砜作为透析膜具有最好的滤过性能; 种植了细胞的生物透析器具有很好的抗凝功能, 能够达到无肝素透析; 同时也证实构建的多层生物芯片人工肾微透析装置具有很好的重吸收、新陈代谢和内分泌功能, 为未来发展便携式或可植入式多功能复合的人工肾透析系统打下了基础.

关键词

微流道芯片
细胞工程
透析
生理功能

近年来, 肾病的发病率和死亡率一直高速增长^[1]. 肾移植是治疗终末期肾病最好的方法, 但由于供体数量的限制, 绝大部分患者无法实现这种治疗^[2]. 因此, 血液透析便成了最主要的治疗方式. 但它需要每周至少 3 次、每次 4 h 的专业透析治疗, 给患者的生活带来诸多不便, 同时高昂的费用也给患者带来沉重的经济负担^[3]. 近 10 年来, 科学家一直致力于改进透析治疗, 如使用更好的透析膜^[4,5], 设计更轻便、可便携式的透析器等^[6,7]. 但这些改进仍不能满足肾病患者的需要. 因为肾脏是人体最为复杂的器官之一, 具有诸多重要的功能, 血液透析仅能够替代其过滤功能, 而诸如重吸收、内分泌和新陈代谢等肾小管功能却不能实现, 导致大量并发症出现^[8]. 目前已经证明这些并发症是肾病患者主要死因^[9]. 另外, 目前商业透析器通常采用中空纤维管式透析结构, 这种结构容易形成凝血并将纤维管堵塞, 纤维管内外压力差也会导致纤维管破裂; 此外, 中空纤维管透析器的清洗较为困难, 不彻底的清洗会降低透析的有效

面积, 进而影响临床治疗效果^[10]. 因此, 研究人员希望通过减小透析器体积、改善过滤效率和构建具有肾小管生理功能的生物人工肾来克服当前血液透析的缺点^[11,12].

随着技术的发展, 微流道技术在细胞培养和生化分析领域越来越受到重视. 微流道技术具有灵活控制流体的优点, 使其接近人体生理条件下的培养环境, 能够控制细胞伸长的尺寸以及高产量的成批培养^[13]. 已有报道采用微流道技术培养如肝细胞、肺细胞及昆虫细胞等真核细胞^[14~18]. 最近, Fissell 课题组^[19,20]已采用微流道技术模拟生理环境体外评估肾小管上皮细胞. Suh 课题组^[21,22]最近也设计和发展了一个微流道装置, 体外构建肾小管动力学条件来培养和分析肾小管细胞, 并获得了满足体外肾小管细胞生存的最佳流体动力学条件. 同时, Kitamori 课题组^[23]也详细研究了人肾近曲小管上皮细胞在微流体作用下的培养条件. 这些工作为构建生物人工肾小管装置奠定了基础. 然而上述研究一般是以构建一

引用格式: 朱文, 李继伟, 崇保和, 等. 多功能复合的人工肾微芯片的制备及功能评估. 科学通报, 2014, 59: 1723–1731

Zhu W, Li J W, Chong B H, et al. Preparation and functional assessment of a multifunctional composite artificial kidney microchip (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2014, 59: 1723–1731, doi: 10.1360/972013-711

个独立的肾小管装置为目标. 在通过培养和种植肾小管上皮细胞赋予该装置肾小管生理功能之后, 它需要外部复杂的连接回路与具有肾小球过滤功能的透析装置联立来组建生物人工肾^[24]. 如此肾小球和肾小管分立的装置显然不利于人工肾的“微缩化”, 无法满足便携式甚至可植入式生物人工肾的发展需求. 在微型透析器方面, Kaazempur-Mofrad 等人^[25]报道了采用微机电系统 MEMS (microelectromechanical systems) 技术结合聚碳酸酯透析膜制备微型透析器的研究; Nissenson 等人^[26]报道了采用芯片和高通量的纳米结构聚醚砜 (polyethersulfone, PES) 膜结合制备微型透析器的研究; Lee 等人^[27]采用平板印刷的方法在硅橡胶材料上制备出微流道, 并与聚氨酯、聚醚砜等膜组装成微流道芯片透析器. 然而上述微流道芯片透析器仅局限于透析器的清除功能, 仍没有将肾小管功能结合起来, 并且其微流道芯片只有一层, 不能很好地缩小透析器体积和提高透析效率. 为解决上述缺点, 本研究设计了更加合理的叠层芯片结构, 并结合细胞组织工程技术, 将肾小球功能和肾小管功能复合在同一微透析装置内, 制备了具有多功能复合的人工肾微芯片透析装置, 为实现便携式或可植入式人工肾透析系统奠定了基础.

1 材料与方法

(i) 微流道芯片的设计. 采用程序自控线切割技术, 将厚度为 0.5 mm 的钛板(纯度 99.5%)加工成如图 1 所示微流道阵列芯片, 芯片面积 72 mm×72 mm.

微流道阵列呈首尾连接的扁 S 形, 单个微流道的宽度 W_1 及其间隔距 W_2 均为 1 mm, 整个微流道所占的面积大约是 40 mm×40 mm. 在微流道的首尾端分别设有 2 个圆孔, 为流体的进出口. 同时芯片上还开有另一个圆孔, 其圆心距离基板边缘的距离 S_2 和 S_3 分别为 8 和 16 mm. 在多层芯片叠装过程中, 此孔具有导通相邻芯片微流道中流体的作用.

(ii) 组装透析器. 多层生物芯片透析器是由上述微流道芯片、透析膜以及装配附属部件组成. 如图 2(a)所示, 透析器基本单元由上、下固体板(硅橡胶夹板)、透析膜片、密封圈和至少 2 块微流道芯片组成. 透析膜完全覆盖微流道面积部分, 相邻两芯片的微流道方向相互垂直. 密封圈在透析膜外围四周, 防止透析过程中血液和透析液从边上溢出. 上、下硅橡胶夹板除了起到密封和紧固的作用外, 其上还设有与微流道芯片相通的小孔, 将输液针插入硅橡胶夹板中, 插入深度恰好与小孔相通, 作为血液和透析液的进出口. 由于该基本单元采用层状叠加的形式, 可方便地根据透析容量任意加减基本单元的数量, 组装成多层生物芯片透析器, 如图 2(b)即为 5 个基本单元叠加的五层芯片生物透析器. 在透析器组装完毕后, 首先进行通水实验, 以验证透析器的密封性是否良好.

(iii) 细胞培养及种植. HK-2 细胞购于中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC), HUVEC 细胞购于上海研谨生物科技有限公司. 采用 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)/高糖(1×)培养基(Thermo, HyClone,

图 1 微流道芯片结构示意图

(a) 示意图; (b) 实物照片

图2 透析器装置示意图

(a) 透析器基本单元; (b) 多层生物芯片透析器; 1, 微流道芯片; 2, 透析膜; 3, 密封圈; 4, 夹板; 41, 螺纹孔

美国)培养细胞, DMEM、胎牛血清(浙江天杭)、双抗(100 U/mL 的青-链霉素, Thermo, 美国)按照 90:10:1 的比例配好培养基。胎牛血清在使用前放入水浴锅中, 56℃下灭活 0.5 h。培养基 2~3 d 换一次, 当细胞覆盖 90%培养皿的时候进行传代。用移液枪移去旧培养液, 采用磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)清洗 1~2 次, 加 2 mL 消化液 TE(0.25%胰蛋白酶, 0.02% EDTA)于培养皿中, 置于 37℃, 5%CO₂ 培养箱中消化 3~5 min, 取出后轻轻摇动培养皿, 倒置显微镜下观察, 如果细胞大部分收缩变圆, 立即加入 3 mL 高糖培养液(DMEM)终止消化。将细胞悬液吸入离心管中, 1000 r/min 离心 5 min 沉淀细胞后, 弃去上清液, 加入 2~3 mL 培养液, 按 1:4 进行传代到新的培养皿中。每 2~3 d 换一次培养液。

将准备好的聚醚砜、混和纤维素、再生纤维素透析膜材料放入 24 孔板中, 每孔加入 1 mL 相同密度(10⁵/cm²)的细胞悬液, 然后将孔板置于 37℃, 5%CO₂ 培养箱中培养, 2 d 更换一次 DMEM 培养液。培养时间根据细胞活性及细胞形貌等实验内容确定。将种植有细胞的透析膜, 连同微流道芯片和密封垫圈组装成如图 2 所示的生物透析器。每层种有细胞的透析膜置于两片微流道芯片之间。生物透析实验至少需要两层芯片生物透析器才能进行(即需 2 个透析器基本单元进行叠加), 其中第 1 层透析膜上表面种植 HUVEC 细胞, 与其上部微流道中通入的血浆相接触, 起到抗凝的效果; 第 2 层透析膜上表面种植 HK-2 细

胞, 与其上部微流道中通入的透析液相接触, 履行肾小管的生理功能。种有上皮细胞的透析膜与种有内皮细胞的透析膜交替叠层排列, 其间被微流道芯片隔开。

(iv) 清除功能。采用尿素和维生素 B₁₂(VitB₁₂)的清除率来表征透析器的清除功能。血液和透析液分别通入上流道进口和下流道进口, 血液流速和透析液流速均为 0.8 mL/min。清除率定义为从血液中移除的物质质量, 其计算公式如下,

$$C(\text{mL}/\text{min}) = \frac{(C_i - C_0) \times Q_B}{C_i}, \quad (1)$$

其中, C 是清除率, C_i 是血液进入透析器的物质浓度, C_0 是血液离开透析器时的物质浓度, Q_B 是血液的流速。

(v) 血液相容性。实验组分为未种植细胞组和种植 3 d 细胞组。血液相容性采用血浆复钙时间来表征。取 200 μL 的血浆和 200 μL 的 CaCl₂(0.025 mol/L)混合均匀后, 用移液枪移取 20 μL 滴在准备好的各组别材料上, 然后采用钢丝钩检测复钙化时间, 第一次勾起纤维丝状物质的时间为血浆复钙时间。

(vi) 重吸收功能。重吸收功能采用钠、钾离子从上流道进入下流道的物质转移量来表征。血液在透析系统中流动一圈之后, 从下流道的出口储存液中取 1 mL 样品, 视为最初浓度。60 min 后, 再取 1 mL 样品, 检测其钠、钾离子浓度。物质转移量采用下面公式计算:

$$\text{物质转移量}=(C_1-C_2)\times V, \quad (2)$$

其中, C_1 为 60 min 后样品离子浓度; C_2 为最初浓度; V 为溶液体积.

将抑制剂哇巴因(ouabain, 0.1 mmol/L)加入透析液中, 然后重复进行上述实验, 以证明物质运转是由 HK-2 细胞的重吸收功能所引起的.

(vii) 代谢及内分泌功能. 透析器的新陈代谢功能采用改变血浆和透析液的 pH, 以检测细胞泌氨功能. 每次透析器在特定的 pH 下进行检测(分别调成 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5 这 6 个等级), 在进行下一个 pH 测定之前, 要在正常培养基条件下培养 2 d, 以保持 pH 稳定. 血浆循环 30 min 后提取样品, 用商用试剂盒(Nessler Reagent, Sigma-Aldrich, 美国)检测氨的浓度. 相应无透析过程静态放置 30 min 的泌氨量作为对照组.

透析器的内分泌功能采用检测分泌的内皮素(endothelin, ET)的浓度来进行评价. 往透析器中通入血液和透析液, 每隔 0.5 h 取一个样品, 连续取 5 次, 采用商业试剂盒(ELISA Reagent, Sigma-Aldrich, 美国)检测内皮素 ET 的浓度.

2 结果与讨论

2.1 清除功能

作为透析器, 最基本的功能便是对血液中毒素的清除能力. 图 3 是两组透析器对尿素的清除率. 如图 3 所示, 在两层芯片组成的透析器中, 未种植细胞的再生纤维素、混和纤维素以及聚醚砜(PES)薄膜对尿素的清除率分别为 9.1%, 29%和 29.4%, 种植细胞后 3 种膜对尿素的清除率分别降低至 8.5%, 9.1%和

12.3%; 在未种植细胞的六层芯片透析器内, 3 种膜对尿素的清除率分别是 40%, 61%和 62%, 而种植细胞后分别是 19%, 34%和 46%. 由此可见, 3 种薄膜在 2 种透析器内对尿素的清除率趋势是一致的, 即 PES 透析器和混和纤维素透析器对尿素的清除率远远大于再生纤维素透析器. 表明 PES 和混合纤维素具有较高的清除率, 比较适合做透析膜材料. 另外, 六层芯片透析器的清除率要远大于两层芯片透析器. 这是因为液体在六层芯片的滞留时间较长, 大约 25 s, 但在两层芯片只有 4 s. 血浆在六层芯片装置中能够与透析液进行更长时间的物质交换, 因此物质的转移量就大, 进而清除率增加. 液体在微装置滞留时间是指液体最初进入装置至液体流出装置所需要的时间. 由于压力降低, 液体在后层微流道芯片中的流速会低于在首层微流道芯片中的流速. 因此随着芯片层数增加其滞留时间大大延长.

尿素的分子质量是 60 Da, 属于小分子范畴. 考虑到大约 50%的尿素在通过肾小管的时候能够被重新吸收, 因此正常生理条件下尿素的清除率应在 50%左右. 而本研究设计的六层芯片透析器清除率高达 60%以上, 表明本研究设计的透析器的清除率功能良好. 在透析膜上培养细胞后, 清除率有所下降. 但数据显示培养细胞后的 PES 透析器对尿素的清除率为 46%, 非常接近正常生理条件下尿素的清除率水平. 细胞在材料表面铺展生长, 自然会堵塞透析膜的一部分小孔, 导致物质转移的有效孔径减少, 因此清除率有所下降. 这也从一定程度上证明了细胞在生物透析器内能够正常地黏附生长.

图 4 为两组透析器对 VitB₁₂ 的清除率. 在两层芯片透析器中, 未种植细胞的再生纤维素、混和纤维素

图 3 各实验组尿素清除率
(a) 两层芯片装置; (b) 六层芯片装置

图4 各实验组 VitB₁₂ 清除率
(a) 两层芯片装置; (b) 六层芯片装置

以及 PES 薄膜对 VitB₁₂ 的清除率分别为 7.1%, 10.5% 和 10.1%, 培养细胞后 3 种膜对 VitB₁₂ 的清除率分别降低至 5.8%, 7.2% 和 8.5%; 在没有培养细胞的六层芯片透析器内, 3 种膜对 VitB₁₂ 的清除率分别是 11%, 51% 和 54%, 而培养细胞后的清除率分别是 9.5%, 29% 和 41%。

VitB₁₂ 分子量是 1355 Da, 属于大分子范畴, 所以对对比尿素的清除率, VitB₁₂ 的清除率要小得多, 正常生理条件下 VitB₁₂ 的清除率一般在 40% 左右。VitB₁₂ 的透过率和膜结构有很大的关系。由于再生纤维素上的孔径较小, 孔密度较低, 孔径分布也不太均匀, 大分子进入薄膜孔径中不能够透过薄膜而被困在孔中, 导致孔径完全堵塞。因此不论是两层芯片装置还是六层芯片装置, VitB₁₂ 在再生纤维素透析器内的清除率都较低。但对于混和纤维素和 PES 薄膜, 由于它们的孔密度较高, 孔径分布也较为均匀, 所以对物质的转运能力较强, 进而透析器芯片层数对 VitB₁₂ 清除率的影响较大。图 4 中可以看出, 两种透析膜材料在六层芯片装置中对 VitB₁₂ 的清除率要远远大于在两层芯片装置中。同样, 种植细胞后也均能使清除率降低。但种植细胞后的 PES 透析器对 VitB₁₂ 的清除率达到 41%, 与正常生理条件下需要的清除率非常吻合。

2.2 血液相容性

当血液和体外物质表面接触时就会发生凝固, 进而导致形成血栓和排异反应^[28]。现行的商用透析器必须使用大量的肝素抗凝药来抗凝, 但长期使用肝素抗凝会导致严重的肝素诱发性血小板减少症及脂质代谢异常。因此, 本研究采用在透析膜表面培养血管内皮细胞的方法, 确保血液不会在透析中发生

凝血现象, 以减少肝素的使用。研究体外血液相容性较为常用的方法是测量血浆复钙时间。当钙离子加入到血浆中时, 内生血凝系统激活凝血素并产生凝血酶, 凝血酶促进纤维蛋白原转变为不溶解的纤维蛋白。这个过程的持续时间称为血浆复钙时间^[29]。图 5 是各实验组血浆复钙时间示意图。图 5(a)显示载玻片、再生纤维素、混和纤维素以及 PES 薄膜的血浆复钙时间分别为 7.0, 5.0, 8.5 和 9.0 min, 未培养细胞的薄膜在相应时间内都出现严重的血浆钙化现象, 血浆基本凝固。图 5(b)显示在 3 种材料表面培养 HUVEC 细胞后, 3 种材料的抗凝时间都有不同程度的提高。这是因为 HUVEC 细胞在材料表面能够合成并分泌抗凝物质, 履行其抗凝功能。本研究发现, PES 薄膜表面培养细胞后基本没有钙化现象, 在实验即将终止的时候才出现很细的纤维丝, 表明血管内皮细胞可以在 PES 薄膜上很好地发挥它的功效。

2.3 重吸收功能

肾脏除了具有清除血液中的毒素之外, 还能够将过滤了的钠、钾、钙离子等人体必需物质重吸收到血液, 从而维持血液中的离子平衡。图 6 和 7 分别显示构建的生物透析器钠离子和钾离子的重吸收量。如图 6 所示, 再生纤维素、混和纤维素和 PES 组成的两层芯片透析器在 60 min 内的重吸收量分别是 3.1, 6.5 和 8.1 mg/cm², 在六层芯片装置中重吸收量分别是 9.0, 21.2 和 26.0 mg/cm²。(i) 六层芯片装置中有三层膜是 HK-2 细胞, 其细胞量要大于两层芯片装置中的细胞量, 而重吸收功能主要由 HK-2 细胞完成; (ii) 血液在六层透析器内滞留的时间较长, 能够与透析器更长时间、更大面积地接触, 有充分的时间来完成

图 5 几种材料的血浆复钙时间示意图

(a) 未培养细胞; (b) 培养 HUVEC 细胞后

图 6 钠离子重吸收示意图

(a) 两层芯片装置; (b) 六层芯片装置

离子交换, 所以六层芯片的重吸收要远远大于两层芯片的重吸收。此外, 图 6 也显示 PES 和混合纤维素组成的生物透析器明显高于再生纤维素组别, 表明细胞在 PES 和混和纤维素透析膜表面的活性较高, 细胞的重吸收功能更旺盛。当 ouabain 加入透析液之后, 所有实验组的钠离子的重吸收量都降低至 1.0 mg/cm^2 以下。Ouabain 能够与 Na^+ , K^+ -ATPase 的结合位点结合, 抑制 Na^+ , K^+ -ATPase 的活性进而特异性地抑制 HK-2 细胞对钠钾离子的转运。加入 ouabain 之后, 所有实验组的重吸收量下降证明了钠离子的吸收转运主要是由细胞来完成。图 7 显示钾离子重吸收量具有相同的变化规律, 证实本研究构建的生物芯片透析器对钠、钾离子均有重吸收功能。

2.4 代谢功能

泌氨代谢功能是肾脏消除酸负载和维持体内酸平衡的必需功能。尽管所有的肾单元都能够泌氨, 但是近曲小管细胞是最主要的泌氨源。无论在体内或

者体外, 近曲小管细胞的泌氨量能够迅速地随着 pH 的变化作出反应^[30]。图 8 是 3 种材料生物透析器的泌氨示意图。随着培养基的 pH 由 7.5 下降到 7.0, HK-2 细胞的泌氨量也显著增加。PES 和混和纤维素上的细胞泌氨量大致相等, 但都大于在再生纤维素上的泌氨量。这是因为细胞在 PES 和混和纤维素上的活性较大, 因此它们的内分泌活动也旺盛。图 8 也显示动态透析后的泌氨量要大于静态无透析过程的对照组, 其中六层芯片透析器透析后的泌氨量大于两层芯片透析器。由于动态透析能使细胞遭受流体剪切力的作用, 促使细胞具有更强的细胞质基质分泌能力, 相对静态组具有更旺盛的内分泌功能。而在六层透析器中, 细胞所受到的剪切力时间较长, 其内分泌功能也更旺盛。

2.5 内分泌功能

内皮素(ET)主要存在于血管内皮中, 除此之外, 各种组织和细胞中也存在, 是调节心血管功能的重

图7 钾离子重吸收示意图
(a) 两层芯片装置; (b) 六层芯片装置

图8 3种材料生物透析器泌氨示意图
(a) 再生纤维素; (b) 混合纤维素; (c) 聚醚砜

要因子,对维持基础血管张力与心血管系统稳定具有重要作用^[31].内皮细胞受到刺激后能够合成并分泌ET.因此,检测生物透析器内血管内皮细胞分泌ET的水平非常重要,将影响透析后的血液中的ET浓度,进而影响透析后患者的身体状况.图9是两类生

物透析器的内皮素ET分泌示意图,其中每类生物透析器均分3组进行检测,即没有种植细胞的空白组、全部种植HK-2细胞和全部种植HUVEC细胞.由图9所示,HUVEC细胞是内皮素的主要分泌细胞,其分泌量要远远大于HK-2细胞.六层芯片装置的分泌量最大,两

图9 各组透析器内皮素浓度示意图
(a) 两层芯片装置; (b) 六层芯片装置

层次之. 六层芯片细胞量较大, 其细胞能够受到充分的剪切力, 细胞的活性较好, 内分泌活动旺盛, 所以六层组的分泌量要大于两层组. 空白组没有细胞, 基本就不会分泌, 但测试的级别是皮克级, 十分微小, 所以可能造成一定的误差. 此外, PES 上细胞分泌的内皮素 ET 较多, 混和纤维素次之, 而再生纤维素最低. 因为细胞在 PES 上的存活率较高, 细胞状态也最好, 所以细胞在 PES 表面能正常发挥自身的生理功能.

3 结论

本研究证实采用细胞工程和微流道芯片技术相结合制备多层生物芯片透析器是可行的. 微型生物芯片透析器采用微流道芯片和商业透析膜制备而成,

其内种植 HK-2 细胞和 HUVEC 细胞以赋予透析器生理功能. 研究结果显示, 构建的透析器对不同分子量的物质均有很好的清除功能, 达到了人体正常生理条件下的清除率水平; 同时, 构建的生物透析器还具有很好的血液相容性、重吸收、新陈代谢和内分泌功能, 很好地履行了肾小管的功能, 弥补了目前血液透析的缺点, 为未来便携式或植入式人工肾的发展打下良好的基础. 此外, 本研究所构建的透析器装置目前经过初步的连续透析运转实验也证实性能稳定, 在长达 2 周的连续透析运转过程中细胞未出现死亡和凋亡的现象. 其原因可能是在透析过程中引入的血液能为种植细胞提供必要的存活营养物质. 更长时间的连续透析实验目前正在进行中.

参考文献

- Joffy S, Rosner M H. Natriuretic peptides in ESRD. *Am J Kidney Dis*, 2005, 46: 1–10
- Song J J, Guyette J P, Gilpin S E, et al. Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nat Med*, 2013, 19: 646–651
- Kjellstrand C M. My addiction: The artificial kidney, the rise and fall of dialysis. *Artif Organs*, 2012, 36: 575–580
- Ye S H, Watanabe J, Takai M, et al. Design of functional hollow fiber membranes modified with phospholipid polymers for application in total hemopurification system. *Biomaterials*, 2005, 26: 5032–5041
- Pullela S R, Andres C, Chen W, et al. Permeability replication of artificial glomerular basement membranes in nanoporous collagen multilayers. *J Phys Chem Lett*, 2011, 2: 2067–2072
- Davenport A, Ronco C, Gura V. Portable and wearable dialysis: Where are we now? *Hemodial Int*, 2010, 14 (Suppl 1): S22–S26
- Davenport A, Ronco C, Gura V. From wearable ultrafiltration device to wearable artificial kidney. In: Ronco C, Rosner M H, eds. *Hemodialysis: New Methods and Future Technology*. Basel: S. Karger AG, 2011. 237–242
- Humes H D, Mackay S M, Funke A J, et al. Tissue engineering of the bioartificial renal tubule assist device: *In vitro* transport and metabolic characteristics. *Kidney Int*, 1999, 55: 2502–2514
- Ozgen N, Terashima M, Aung T, et al. Evaluation of long-term transport ability of a bioartificial renal tubule device using LLC-PK₁ cells. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19: 2198–2207
- Saito A, Sawada K, Fujimura S. Present status and future perspectives on the development of bioartificial kidneys for the treatment of acute and chronic renal failure patients. *Hemodial Int*, 2011, 15: 183–192
- Fissell W H, Roy S, Davenport A. Achieving more frequent and longer dialysis for the majority: Wearable dialysis and implantable artificial kidney devices. *Kidney Int*, 2013, 84: 256–264
- Dankers P Y W, Boomker J M, Huizinga-van der Vlag A, et al. Bioengineering of living renal membranes consisting of hierarchical, bioactive supramolecular meshes and human tubular cells. *Biomaterials*, 2011, 32: 723–733
- Walker G M, Zeringue H C, Beebe D J. Microenvironment design considerations for cellular scale studies. *Lab Chip*, 2004, 4: 91–97
- Leclerc E, Sakai Y, Fujii T. Cell culture in 3-dimensional microfluidic structure of PDMS (polydimethylsiloxane). *Biomed Microdevices*, 2003, 5: 109–114
- Powers M J, Domansky K, Kaazempur-Mofrad M R, et al. A microfabricated array bioreactor for perfused 3D liver culture. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 78: 257–269
- Viravaidya K, Sin A, Shuler M L. Development of a microscale cell culture analog to probe naphthalene toxicity. *Biotechnol Progr*, 2004, 20: 316–323
- Walker G M, Ozers M S, Beebe D J. Insect cell culture in microfluidic channels. *Biomed Microdevices*, 2002, 4: 161–166
- Huh D, Matthews B D, Mammoto A, et al. Reconstituting organ level lung functions on a chip. *Science*, 2010, 328: 1662–1668
- Ferrell N, Desai R R, Fleischman A J, et al. A microfluidic bioreactor with integrated transepithelial electrical resistance (TEER) measurement electrodes for evaluation of renal epithelial cells. *Biotech Bioeng*, 2010, 107: 707–716

- 20 Ferrell N, Ricci K B, Groszek J, et al. Albumin handling by renal tubular epithelial cells in a microfluidic bioreactor. *Biotech Bioeng*, 2012, 109: 797–803
- 21 Jang K J, Suh K Y. A multi-layer microfluidic device for efficient culture and analysis of renal tubular cells. *Lab Chip*, 2010, 10: 36–42
- 22 Jang K J, Cho H S, Kang D H, et al. Fluid-shear-stress-induced translocation of aquaporin-2 and reorganization of actin cytoskeleton in renal tubular epithelial cells. *Integr Biol*, 2011, 3: 134–141
- 23 Gao X F, Tanaka Y, Sugii Y, et al. Basic structure and cell culture condition of a bioartificial renal tubule on chip towards a cell-based separation microdevice. *Anal Sci*, 2011, 27: 907–912
- 24 Saito A, Sawada K, Fujimura S, et al. Evaluation of bioartificial renal tubule device prepared with lifespan-extended human renal proximal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27: 3091–3099
- 25 Kaazempur-Mofrad M R, Vacanti J P, Krebs N J, et al. A MEMS-based renal replacement system. In: *Solid-State Sensor, Actuator and Microsystems Workshop*, 2004 June 6–10, Hilton Head Island. 67–70
- 26 Nissensohn A R, Ronco C, Pergamit G, et al. The human nephron filter: Toward a continuously functioning, implantable artificial nephron system. *Blood Purificat*, 2005, 23: 269–274
- 27 Lee K H, Kim D J, Min B G, et al. Polymeric nanofiber web-based artificial renal microfluidic chip. *Biomed Microdevices*, 2007, 9: 435–442
- 28 Xu F J, Li Y L. Heparin-coupled poly(poly(ethyleneglycol) monomethacrylate)-Si(111) hybrids and their blood compatible surfaces. *Biomacromolecules*, 2005, 6: 1759–1768
- 29 Wang D A, Ji J, Feng L X. Selective binding of albumin on stearyl poly(ethylene oxide) coupling polymer-modified surfaces. *Biomaterials*, 2001, 12: 1123–1146
- 30 Hörl W H, Koch K M, Lindsay R M, et al. *Replacement of Renal Function by Dialysis*. 5th ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. 313
- 31 吕民, 符邵鹏, 张秀和. 高肺血流致肺动脉高压幼猪模型中血清内皮素水平的变化. *中国实验诊断学*, 2012, 8: 1360–1362

Preparation and functional assessment of a multifunctional composite artificial kidney microchip

ZHU Wen, LI JiWei, CHONG BaoHe & YANG XueBing

State Key Laboratory of Material Processing and Die & Mould Technology, School of Material Science and Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

A highly parallel microfluidic array chip was fabricated using micro-flow channel technology. By merging the advantages of microfluidic chips with cell engineering, a multifunctional composite artificial kidney microchip with glomerular filtration and renal tubule physiological activity was constructed. Both renal proximal tubular epithelial cells (HK-2) and vascular endothelial cells (HUVEC) were seeded on the dialysis membranes, which, together with the microfluidic array chips, are assembled into a multilayer artificial kidney microchip dialyzer. Two types of dialyzer devices with two-layered and six-layered chips were prepared and their functions assessed and compared. We found that the dialyzer device with six-layered chips had higher filtration efficiency; the best filtration performance in this device occurred with polyether sulfone dialysis membranes plated with cells. The device constructed with cells plated on the dialysis membrane has a good anticoagulant function and can be used in non-heparin dialysis. The reabsorption function, metabolic function and endocrine function of the resulting multilayer artificial kidney microchip dialyzer were also demonstrated. This methodology may be useful in developing multifunction composite artificial kidneys that can act as portable or implantable hemodialysis systems.

microfluidic chip, cell engineering, dialysis, physiological function

doi: 10.1360/972013-711