

LIU Congjin, ZHOU Haoxiang, WEI Dongping, SUN Lianwen, FAN Yubo, YANG Xiao. Construction and Validation of Blood Vessel-bone Matrix Interactive Microfluidic Chip Experimental System (in Chinese). *Chinese Journal of Space Science*, 2025, 45(2): 517–528. CSTR:32142.14.cjss.2024-0144. DOI:10.11728/cjss2025.02.2024-0144

血管-骨基质交互微流控芯片实验 体系的构建及验证*

刘丛锦 周浩翔 魏栋苹
孙联文 樊瑜波 杨 肖

(生物力学与力生物学教育部重点实验室, 高端医疗装备与器械创新及转化工业和信息化部重点实验室, 国家医学攻关(医工结合方向)

高端医疗装备与器械产教融合创新平台, 北京航空航天大学生物与医学工程学院 北京 100191)

摘 要 晚期糖基化终末产物 (AGEs) 是葡萄糖与骨胶原发生非酶糖基化交联的产物, 与失重性骨丢失的发生机制相关, 而其在骨基质中积聚的机制尚不明确. 微重力下流速较慢的 L 型骨微血管数量增加, 可能与 AGEs 在骨中的积聚有关. 为研究流速对血管内葡萄糖分子向骨基质的运输及 AGEs 生成的影响, 开发了体外模拟血管-骨交互界面的双层通道微流控芯片实验体系, 自研可长时连续定向供液的双注射泵系统搭载于芯片, 通过实验验证体系的生物相容性、稳定性及组织间交互性. 结果显示, 芯片内通道主要反应区液体应力分布均匀, 为层流流动; 加载 $2.88 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 $0.38 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的高糖培养基 72 h 后, 芯片中内皮细胞可正常生长; 低流量比高流量的葡萄糖分子经微孔膜向下层胶原通道扩散的速率更高, 胶原中生成的 AGEs 更多. 本文构建的实验体系具有良好的生物相容性、长时运行稳定性及组织间交互性, 可为后续开展骨基质 AGEs 积聚的生物物理学机制奠定技术基础, 具备应用于空间生命科学研究的潜力.

关键词 晚期糖基化终末产物, 失重性骨丢失, 血液流速, 微流控芯片, 连续定向供液系统

中图分类号 V524

Construction and Validation of Blood Vessel-bone Matrix Interactive Microfluidic Chip Experimental System

LIU Congjin ZHOU Haoxiang WEI Dongping
SUN Lianwen FAN Yubo YANG Xiao

(Key Laboratory of Biomechanics and Mechanobiology (Beihang University), Ministry of Education; Key Laboratory of Innovation and Transformation of Advanced Medical Devices, Ministry of Industry and Information Technology; National Medical Innovation

* 中央高校基本科研业务费 (JKF-20240765, JKF-20240586), 载人空间站工程空间科学与应用项目 (KJZ-YY-NSM0504) 和国家自然科学基金区域联合基金项目 (U20A20390) 共同资助

2024-10-30 收到原稿, 2025-02-07 收到修定稿

©The Author(s) 2025. This is an open access article under the CC-BY 4.0 License
(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Platform for Industry-Education Integration in Advanced Medical Devices (Interdiscipline of Medicine and Engineering);
School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 100191)

Abstract Advanced Glycation End Products (AGEs) in bone matrix are the products of non-enzymatic glycation of glucose and collagen, which are closely related to the mechanism of weightless bone loss. However, how AGEs accumulate in bone matrix remains unclear. The type L microvessels with slower blood flow velocity were increased under microgravity, which may be related to the accumulation of AGEs in bone. To study the effects of flow velocity on the transport of intravascular glucose molecules into bone matrix and the formation of AGEs in bone matrix, a bilayer channel microfluidic chip experimental system was constructed to simulate the blood vessel-bone matrix interface *in vitro*. A self-developed double-injection-pump continuous directional liquid supply system was applied to the chip, and the biocompatibility, stability and interorganizational interactivity of the system were verified by experiments. The results show that the fluid stress distribution in the main region of the channel in fabricated chip is uniform, and the flow is laminar. The endothelial cells in microfluidic chips could grow normally after loading high sugar medium of $2.88 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and $0.38 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ for 72 h, respectively. The diffusion rate of glucose molecules from to the lower collagen channel through the microporous membrane was higher under low flow rate loading than under high flow rate loading, and more AGEs generated in collagen. The experimental system constructed in this paper has excellent biocompatibility, long-term operational stability and interorganizational interactivity, which lays a technical foundation for further in-depth research on biophysical mechanisms related to AGEs accumulation in bone matrix, and has the potential to be applied to space life science research.

Key words Advanced glycation end products, Weightless bone loss, Blood flow velocity, Microfluidic chip, Continuous directional fluid supply system

0 引言

航天员长期空间飞行时会发生失重性骨丢失,这一直是深空探测的主要生理障碍之一,但失重性骨丢失的发生机制尚不明确^[1,2].骨组织由有机胶原基质及无机矿物组成,其中胶原赋予骨骼韧性^[3],并作为矿物质沉积的基质影响骨骼硬度^[4],在维持骨力学性能过程中起重要作用.课题组前期研究发现,模拟微重力效应下,大鼠后肢松质骨胶原基质与葡萄糖发生非酶糖基化反应生成的晚期糖基化终末产物(Advanced Glycation End Products, AGEs)显著增加,并引起骨代谢紊乱、骨微观结构恶化、骨基质力学性能下降^[5,6],提示 AGEs 在失重性骨丢失中发挥着重要作用.然而,微重力下大鼠后肢松质骨基质中 AGEs 积聚的具体机制尚不清楚.

松质骨周围存在大量骨微血管,为骨组织供应氧气、各类生长调节因子及葡萄糖等营养物质^[7].研究发现,模拟微重力效应下大鼠后肢骨窦状 L 型微血管显著增加^[8,9],基底膜孔径增大^[10],血管内血流速度降

低^[11].微重力下 L 型微血管中较慢的流速是否增加了葡萄糖分子扩散至骨基质的概率,从而引起胶原内 AGEs 的增加,目前尚不明确.因此,研究不同流速对葡萄糖向骨胶原转运及胶原中 AGEs 生成的影响,有助于阐明骨基质中 AGEs 积聚的原因,从新的视角探寻失重性骨丢失的发生机制.

开展上述实验研究需在体外模拟组织间交互作用并实时观测小分子扩散,而微流控芯片具有体积小、功耗低、集成度高等优点,是体外研究血管-骨基质组织交互作用及物质跨屏障转运的首选^[12,13],同时也为后续开展空间站匹配实验提供技术支撑.根据实验需求,设计了一款包括上下双层流道和多孔透明聚酯(PETE)膜间隔的微流控芯片.芯片采用透光聚二甲基硅氧烷(PDMS)材料制造^[14],以便观察上层流道葡萄糖分子向下层胶原通道的扩散情况.

研究中葡萄糖分子和胶原反应生成 AGEs 至少需要 3 天,因此需对芯片加载长时不间断的稳定流动刺激.目前在微流控芯片培养系统中,流体控制装置主要通过蠕动循环和注射两种方式灌注培养基^[15].其

中, 蠕动泵虽然可以实现长时流动, 但产生的液体脉动可能会破坏细胞在芯片中的生长状况^[16]. 而注射灌注方式虽然可以通过步进电机程序性控制注射器精确、均匀输送/抽取液体, 但由于注射器容积有限, 单向供液时间较短^[17]. 目前可以实现长时加载稳定单向液体的装置尚依赖于进口, 成本较高, 因此本文研发了一款长时连续定向供液系统搭载于微流控芯片, 通过注射/抽取流道的切换和两台注射泵换向的配合实现芯片内部液体的长时单向稳定流动.

为验证实验体系的生物相容性、供液系统的运行稳定性及微流控芯片的交互性, 本文对芯片加载了不同流速的高糖培养基以检测长时培养下内皮细胞的生长状况, 还检测了流道中葡萄糖扩散至胶原的情况, 以及 3 天后胶原中的 AGEs 生成情况.

1 实验体系的构建

1.1 微流控芯片的设计和制造

研究设计的血管-骨基质交互微流控芯片为上下双层流道芯片, 每层流道高度为 500 μm 、宽度为 1000 μm , 主要流道的长度为 1 cm, 两层流道通过带有约 10 μm 孔径的 PETE 膜分隔 (见图 1). 采用模塑法制造微流控芯片, 利用 3D 打印技术制造上层及下层芯片模具. PDMS 弹性体基料和固化剂按比例混合浇筑成形用于制造上下层芯片, 等离子枪处理芯片表面进行封接. 芯片总厚度为 6 mm, 便于显微镜观察.

上层流道灌注高糖培养基溶液用于模拟血管内血液流动, 下层通道灌注胶原模拟骨基质, PETE 膜用于模拟血管基底膜^[18].

1.2 微流控芯片流道内液体流动数值模拟

研究表明, 骨中窦状和非窦状毛细血管网内内皮细胞受到的剪切应力分别约为 0.2 Pa 和 1.5 Pa^[19]. 流体剪切力公式如下:

$$Q = \frac{WH^2\tau}{6\mu}. \quad (1)$$

其中, Q 为加载流量 ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$), W 为芯片主要流道的宽度 (μm), H 为芯片主要流道的高度 (μm), τ 为剪切应力 (Pa), μ 为黏度 ($\text{kg} \cdot \text{m} \cdot \text{s}^{-1}$). 根据公式分别计算得到双注射泵连续定向供液系统对血管-骨基质交互微流控芯片加载的液体流量应为 $0.38 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 $2.88 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

将微流控芯片通道 3D 模型导入 Fluent 软件 (Fluent Inc., 美国), 设定上层通道进口液体流量分别为 $Q_H = 2.88 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 或 $Q_L = 0.38 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 流体方向垂直于水平面, 设置流体密度 $\rho = 1 \times 10^3 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$, $\mu = 1.3 \times 10^{-3} \text{ kg} \cdot \text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, 设定通道内流体不可压缩. 在所有壁面上施加无滑移边界条件. 计算通道液体流速和壁面剪切力分布 (见图 2).

1.3 双注射泵连续定向供液系统的设计和研制

常用的单一注射泵由于注射器容量限制, 每隔一段时间须切换液体流动方向, 因此不能对微流控芯片内的贴壁细胞提供长时间的连续单向流剪力. 本文自

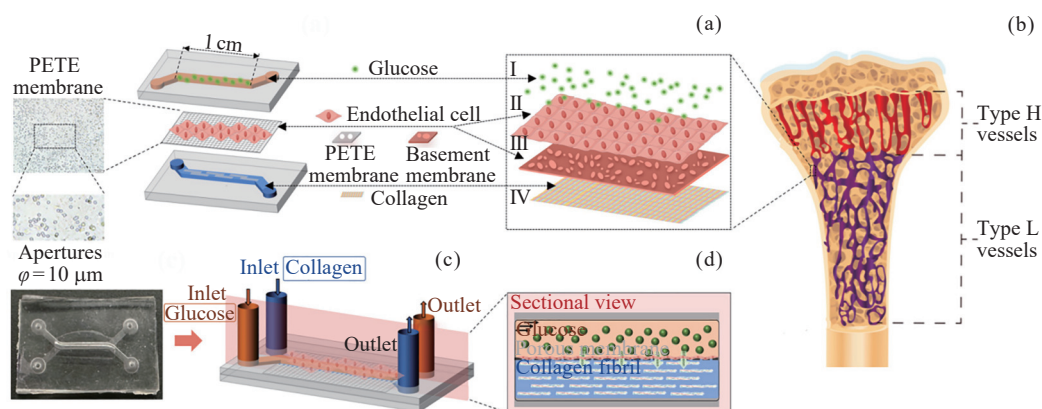


图 1 血管-骨基质交互微流控芯片设计. (a) 微流控芯片三维结构, (b) 微流控芯片模拟的血管-骨基质交互界面, (c) 微流控芯片实物, (d) 微流控芯片内交互界面剖面

Fig. 1 Design of blood vessel-bone matrix interactive microfluidic chip. (a) 3D structural diagram of microfluidic chip, (b) the blood vessel-bone matrix interactive interface simulated by microfluidic chip, (c) the picture of microfluidic chip, (d) the sectional view of interactive interface inside microfluidic chip

研了一套双注射泵连续定向供液系统(见图3), 系统具备四条流道管路、两台注射泵, 每台注射泵各有一条注射流道和一条抽取流道, 且同一注射泵的两条流道由一个电磁夹管阀(WK02-417-3/5, 杭州沃坤科技有限公司, 中国)同时控制, 开放一条流道的同时关闭另一条流道. 继电器(JQC-3 FF-S-Z, 深圳市维芯电子有限公司, 中国)控制电磁夹管阀通断电以改变流道的开放/关闭状态. 步进电机改变注射泵推板运动方向控制注射器活塞运动, 使其在注射/抽取液体的

两种工作模式间切换.

在切换工作模式时, 单片机同时向两个注射泵和继电器发送指令. 注射泵收到指令后切换步进电机旋转方向, 改变注射器的注射/抽取状态; 继电器收到指令后改变电磁夹管阀的通断电状态, 使同一注射泵两条流道开关状态切换. 通过上述操作可实现流经微流控芯片流道中的液体不间断, 且方向保持不变.

2 实验体系的验证

2.1 微流控芯片内的胶原构建及细胞培养

将 I 型鼠尾胶原原液(354236, CORNING, 美国)用 PBS 和 NaOH 溶液(C44728, Thermo Fisher, 美国)、双蒸水配置成浓度为 $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的胶原溶液. 将胶原溶液注入芯片下层通道, 放置于 37°C 培养箱中孵育 2 h 使胶原自组装成纤维结构, 仿生骨组织胶原基质.

将高糖 DMEM 培养基(C11965500 BT, Thermo Fisher, 美国)、胎牛血清(SH30070.031, Hyclone,

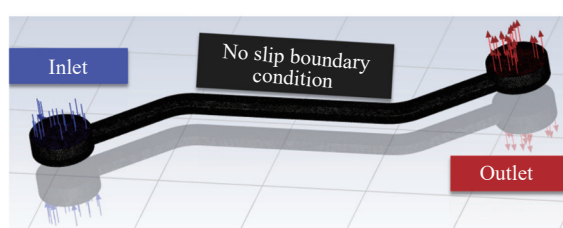


图2 Fluent 软件对微流控芯片上层流道内液体流动进行数值模拟

Fig. 2 Numerical simulation of fluid flow in upper channel of microfluidic chip by Fluent software

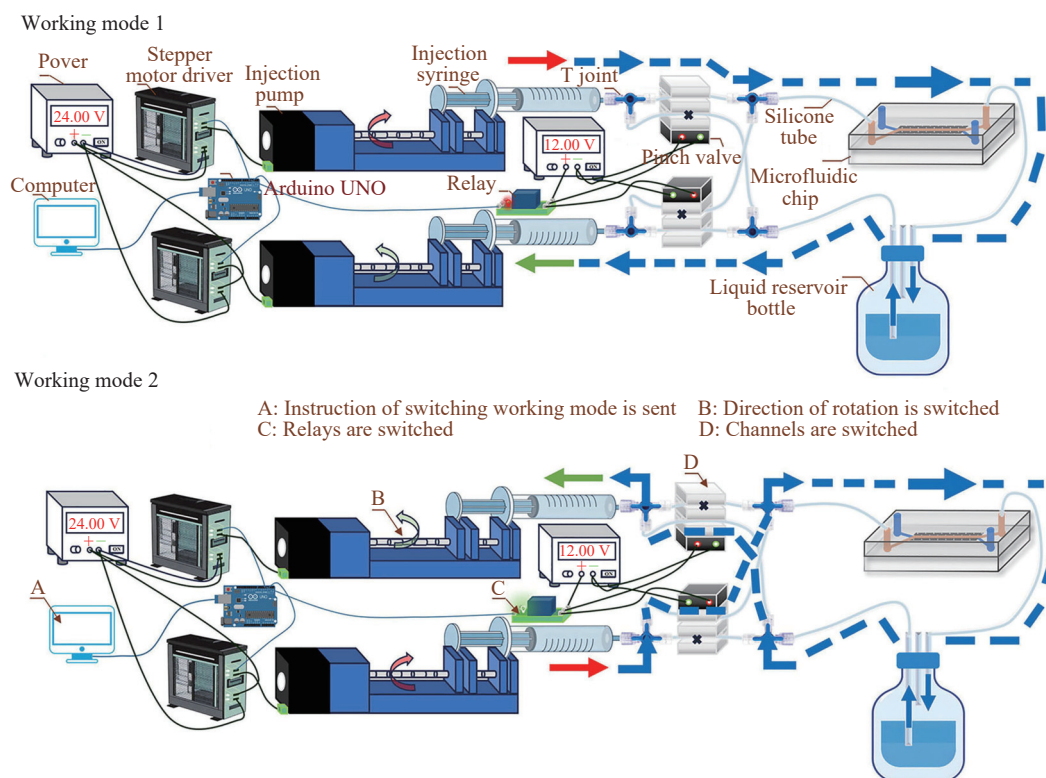


图3 双注射泵连续定向供液系统不间断单向供液原理

Fig. 3 Schematic of double-injection-pump continuous directional liquid supply system supplying uninterrupted unidirectional liquid

美国)、青霉素-链霉素-两性霉素 B 混合溶液 (P7630, 北京索莱宝科技有限公司, 中国)、高糖 DMEM 粉末 (12100061, Thermo Fisher, 美国) 配置为葡萄糖浓度为 40 mmol 的高糖培养基溶液, 用于细胞培养. 将密度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的 EA.hy926 内皮细胞接种于芯片上层流道内培养 8 h, 培养环境为 37°C , 5% CO_2 . 细胞贴壁于 PETE 膜后补充培养基, 继续培养 24 h 至 PETE 膜上形成单层内皮细胞层.

2.2 双注射泵连续定向供液系统对芯片进行动态加载

葡萄糖扩散观测实验中, 供液系统将 40 mmol FITC-荧光葡萄糖溶液注入未接种内皮细胞的芯片上层流道中加载 30 min. 内皮细胞动态培养及胶原 AGEs 生成实验中, 供液系统将高糖培养基注入芯片上层流道, 连续定向供液加载 3 天. 根据流速将实验设置为三组: 对照组 (静置培养)、低流量组 ($0.38 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) 和高流量组 ($2.88 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$).

2.3 免疫荧光染色

对培养前以及培养 3 天后各组芯片中的细胞进行免疫荧光染色. 将 PETE 膜取出, 4% 多聚甲醛 (P1110, 北京索莱宝科技有限公司, 中国) 室温固定 10 min, 0.1% 的 Triton X-100 (DE-0694 A, 北京拜尔迪生物技术有限公司, 中国) 室温孵育 5 min, 4% 的 BSA (36101 ES, 上海翊圣生物科技有限公司, 中国) 封闭 30 min, CD31 一抗 (1:50, ab182981, Abcam, 英国) 4°C 孵育过夜, 加入 Cy3 羊抗兔二抗 (1:100, A0516, 上海碧云天生物技术有限公司, 中国) 室温孵育 2 h, 抗荧光淬灭封片剂 (P0126, 上海碧云天生物技术有限公司, 中国) 封片后, 激光共聚焦显微镜 (SP8, Leica, 德国) $63 \times$ 油镜拍照.

2.4 葡萄糖在胶原中的扩散检测

使用激光共聚焦显微镜 (SP8, Leica, 德国) 在 $10 \times$ 物镜下实时观测 30 min 内各组微流控芯片上层流道中的荧光葡萄糖分子向下层胶原通道的扩散情况. 前 5 min 内每隔 30 s 层扫一次, 5~10 min 内每隔 1 min 层扫一次, 10 min 后每隔 10 min 层扫一次, 每次层扫分别记录上、下通道内各 10 层的荧光强度, 每层间隔 $50 \mu\text{m}$. 并根据菲克第一定律^[20], 有

$$J = P_D (C_{\text{vessel}} - C_{\text{collagen}}). \quad (2)$$

计算各组扩散过程内垂直方向的扩散-渗透系数 $P_D (\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1})$. 其中, J 为扩散通量 ($\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$), 即单

位时间单位截面内扩散至胶原的葡萄糖粒子数, C_{vessel} 为上层模拟血管流道内荧光葡萄糖浓度 ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), C_{collagen} 为下层胶原基质内的荧光葡萄糖浓度 ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). 由于胶原中葡萄糖初始浓度为 $0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 且用各层平均荧光强度代表葡萄糖浓度, 式 (2) 可进一步变形为

$$\frac{dI_{\text{collagen}}}{Adt} = P_D \frac{I_{\text{vessel}}}{V_{\text{vessel}}}. \quad (3)$$

其中, I_{collagen} 为胶原内层平均葡萄糖荧光强度 (AU), A 为荧光成像的横截面积 (μm^2), t 为扩散时间 (s), I_{vessel} 为血管流道内初始葡萄糖荧光强度 (AU), V_{vessel} 为血管流道内荧光成像的光学体积 (μm^3).

2.5 傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 检测 AGEs 含量

培养 3 天后, 提取各组微流控芯片下层流道内的胶原, 放置于 FTIR 显微光谱仪 (AIM-9000, 岛津, 日本) 的金刚石载物台上, 以透射模式扫描样本, 光阑大小为 $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$, 光谱范围为 $3500 \sim 500 \text{ cm}^{-1}$ 波数, 分辨率为 2 cm^{-1} , 每个光阑扫描 16 次后计算平均值, 减去被测样本的基底光谱, 并进行自动大气校正.

使用 IR solution (Version 2.20, 岛津, 日本) 提取光谱, 如图 4(a) 所示, 分析方法同课题组先前研究^[6]. 具体来说, 对光谱进行平滑处理, 平滑数为 10. 使用 Origin 软件 (Version 2018, Originlab, 美国) 对谱图中酰胺 I 带 ($1600 \sim 1710 \text{ cm}^{-1}$) 进行高斯分峰 (见图 4b), 分成 7 个子峰: 1610, 1630, 1645, 1661, 1678, 1692, 和 1702 cm^{-1} . 通过计算子峰 1678 cm^{-1} 和 1692 cm^{-1} 的比值得到 AGEs 含量^[21].

使用 GraphPad Prism 软件 (Version 10.1.0, GraphPad, 美国) 进行统计学分析, 数据均采用均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示, 各组数据符合正态分布且方差齐, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), LSD 法进行事后检验, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异.

3 结果

3.1 芯片内液体加载仿真模拟结果

利用 Fluent 软件进行数值模拟计算, 结果显示对芯片上层流道分别加载流量为 $Q_L = 0.38 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 $Q_H = 2.88 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的液体后, 上层流道内流速 (见

图 5 a, b) 及壁面剪切应力均分布均匀 (见图 5 c, d), 雷诺数 Re 均远小于 2000, 液体流动状态表现为层流。

3.2 血管-骨基质交互微流控芯片生物相容性

在微流控芯片中培养 EA.hy926 细胞 24 h 后, 发现其在 PETE 膜上生长状态良好, 汇合度较高, 且可以检测到内皮细胞标志物 CD31 的表达, 如图 6(a) 所示。静置培养或使用双注射泵系统加载高/低流量高糖培养基培养 3 天后, 微流控芯片中内皮细胞均能保持正常生长, 如图 6(b)~(d) 所示, 说明芯片

具有良好的生物相容性。在静置和 $0.38 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 加载情况下, 内皮细胞排布较为紧密, 形态呈卵圆形。但在 $2.88 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 加载情况下, 显微镜下可观察到的内皮细胞数量较少, 如图 6(d) 所示。

3.3 不同流速下葡萄糖分子短时扩散情况

葡萄糖扩散实验结果显示, 相较于静置组, 加载 $0.38 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 $2.88 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 组在 30 min 内扩散的葡萄糖分子较少 (见图 7)。在三组中, 前 180 s 胶原中层平均荧光强度均近似线性增加, 如图 8(a)~

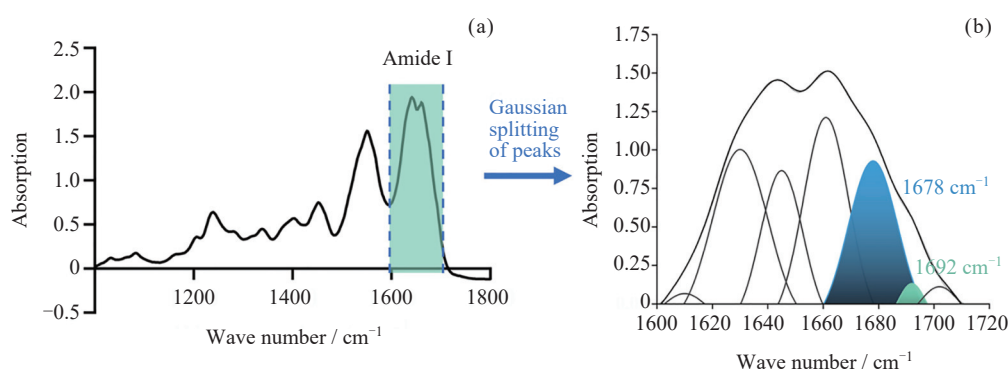


图 4 FTIR 检测 AGEs 含量. (a) 提取酰胺 I 带红外吸收值, (b) 高斯分峰

Fig. 4 Detection of AGEs content by FTIR. (a) Extracting the infrared absorption of Amide I, (b) Gaussian splitting of peaks

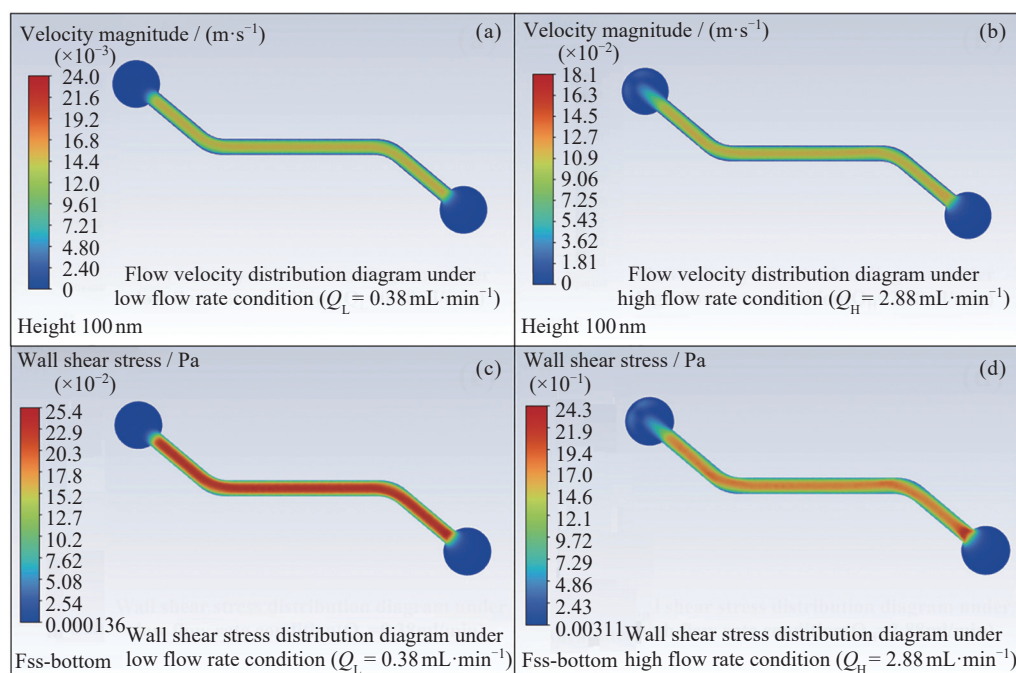


图 5 数值模拟血管-骨基质交互微流控芯片上层流道内的液体流动情况

Fig. 5 Numerical simulation of fluid flow in upper channel of blood vessel-bone matrix interactive microfluidic chip

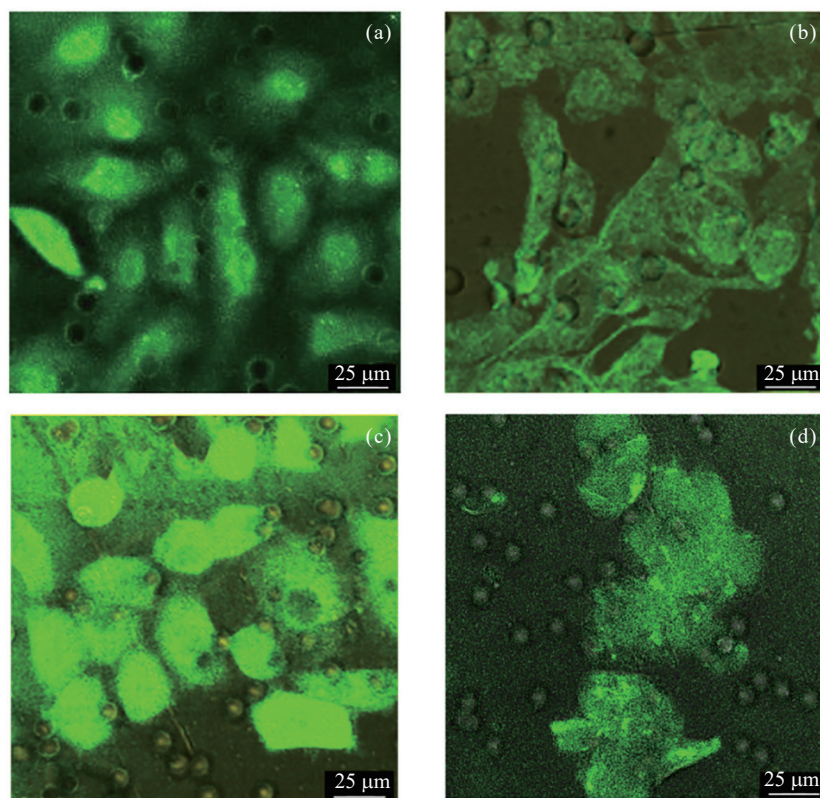


图6 免疫荧光染色检测动态培养前(a)以及静置(b)、低流速(c)、高流速(d)动态培养3天后微流控芯片中内皮细胞CD31表达

Fig. 6 CD31 expression of ECs in the microfluidic chip (a) before and after 3-day dynamic culture under static (b), low (c) and high (d) flow velocity conditions were detected by immunofluorescence staining

(c)所示, 计算得到该扩散过程的垂直扩散-渗透系数分别为 $P_{D_static}=1.29 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, $P_{D_low}=0.725 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, $P_{D_high}=0.0806 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, 如图8(d)~(f)所示, 随着加载流速的增加, P_D 逐渐下降, 说明随着流速的增加, 葡萄糖的扩散逐渐受到抑制. 600 s以后, 静置组胶原中层平均荧光强度继续线性增加, 如图8(d)所示, 随后维持不变; 加载 $0.38 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 液体组胶原中层平均荧光强度在达到最高点后, 开始逐渐下降(见图8e); 加载 $2.88 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 液体组胶原中层平均荧光强度呈波动变化(见图8f).

3.4 不同流速培养3天后骨胶原中AGEs的生成情况

静置培养或利用双注射泵连续定向供液系统加载高/低流量高糖培养基培养3天后, 通过FTIR检测血管-骨基质交互芯片中胶原AGEs的生成情况. 结果发现, 随着流速的增加, 尽管由于检测样本量较少, 无显著性变化, 但胶原AGEs含量仍呈减少趋势

(见图9), 提示流速增加可能会通过减少葡萄糖分子向胶原的扩散减少AGEs的生成.

4 讨论与结论

搭建了一种组织交互微流控芯片实验体系, 包括用于模拟血管-骨基质交互界面的上下双层通道微流控芯片及能为芯片提供连续定向液体流动的双注射泵系统. 其中, 芯片上下双层通道的设计旨在模拟血管中生物分子向骨组织的物质运输. 血管与其他组织间进行物质交换的屏障是由内皮细胞和血管基底膜构成的^[22], 葡萄糖分子只有先穿过内皮细胞间隙或被内皮细胞转运蛋白转运, 再穿过多孔的血管基底膜^[23], 才能扩散进入组织中, 因此本研究中的多孔膜上接种单层内皮细胞是在血管化类器官芯片中模拟血管屏障的有效方法^[24]. 目前常用的多孔膜有PDMS膜和商用合成膜, 包括聚酯膜(Polyester Membrane)和聚碳酸酯膜(Polycarbonate Mem-

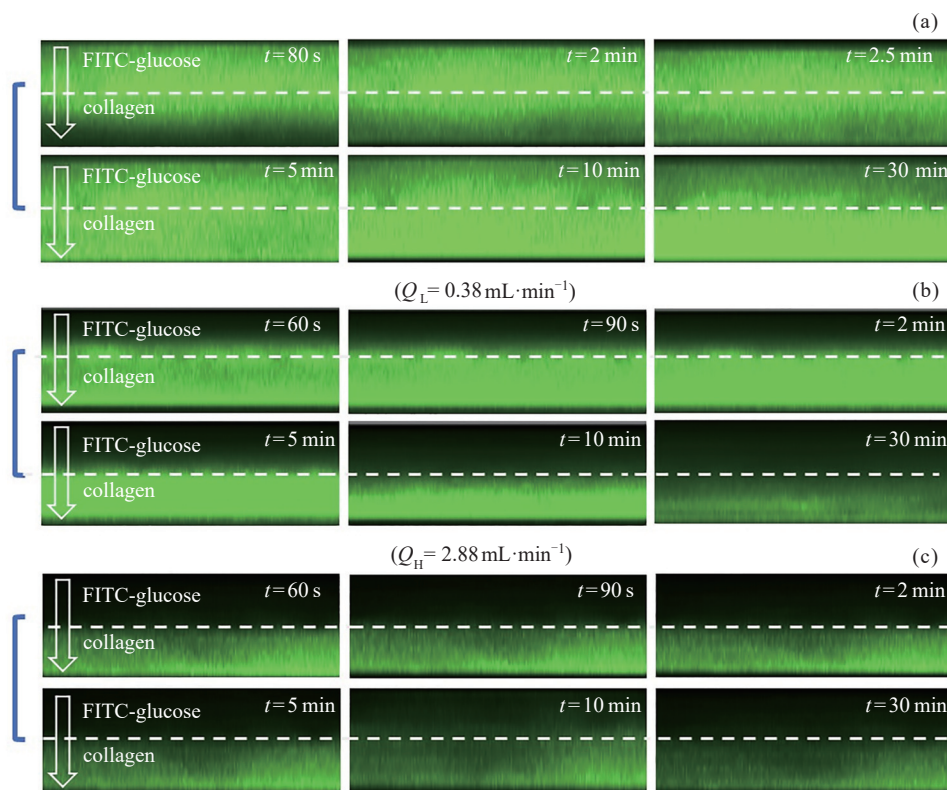


图7 激光共聚焦观测静置(a)、低流速(b)、高流速(c)状态下血管-骨基质交互微流控芯片中葡萄糖分子向胶原的扩散情况

Fig. 7 Diffusion of glucose molecules into collagen in the microfluidic chip under static (a), low (b) and high (c) flow velocity conditions observed by the laser confocal microscopy

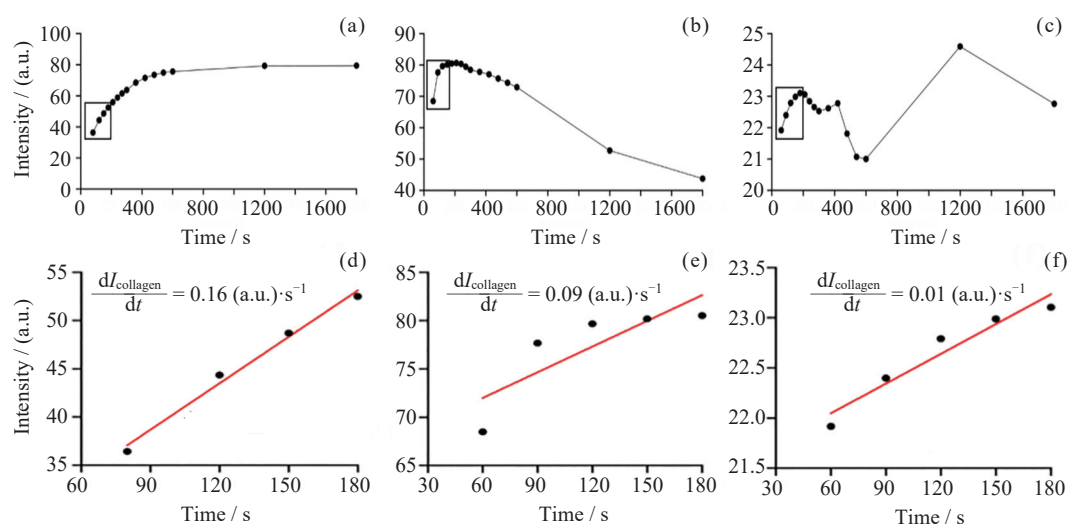


图8 静置(a)(d)、低流速(b)(e)和高流速(c)(f)状态下微流控芯片中葡萄糖分子荧光强度随时间的变化情况

Fig. 8 Changes in the fluorescence intensity of glucose molecule with time in the microfluidic chip under static (a)(d), low (b)(e) and high (c)(f) flow velocity conditions

brane) 等. PDMS 膜聚合物为网状结构会导致葡萄糖小分子的阻滞, 因此本研究中选择不会吸收小分子

的、力学强度足够支持内皮细胞且透光性更好的大孔径 (10 μm) PETE 膜来模拟基底膜^[18,25]. 另外, 由于

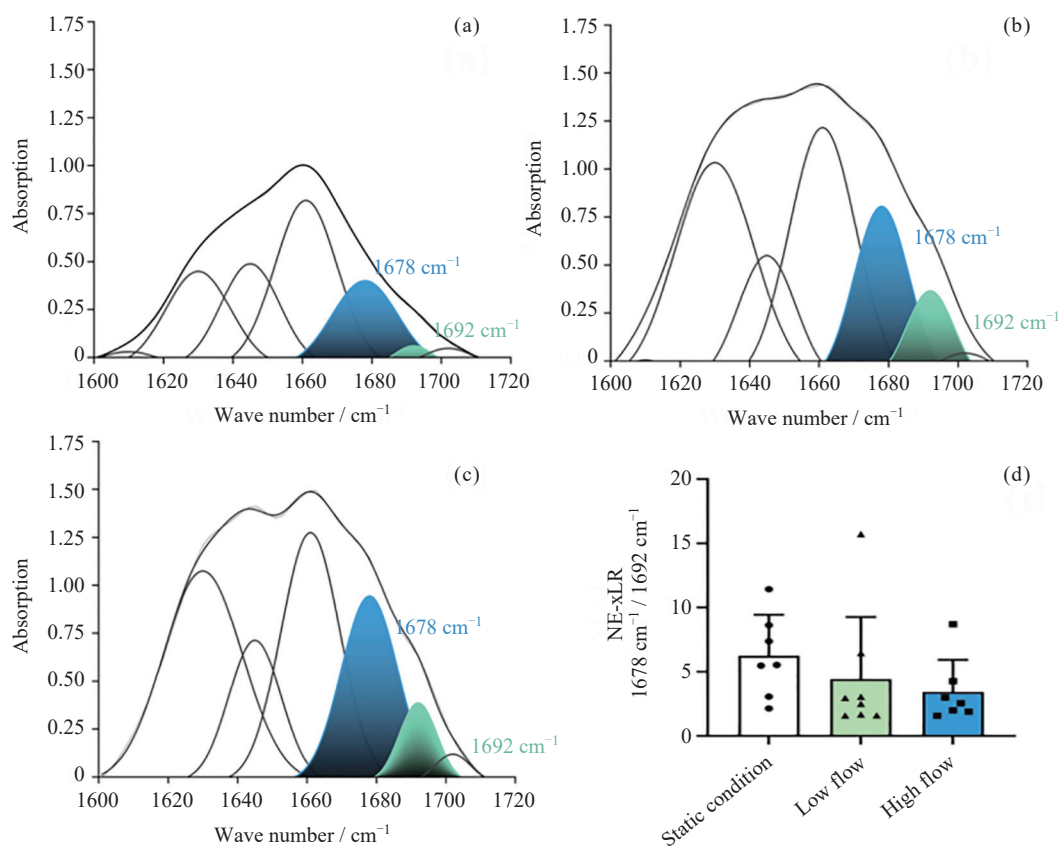


图9 双注射泵连续定向供液系统对微流控芯片进行动态培养3天,通过FTIR检测静置(a)、低流速(b)和高流速(c)情况下胶原中AGEs含量定量分析统计结果(d)

Fig. 9 Microfluidic chip was dynamically cultured for 3 days using a dual-syringe pump continuous directional infusion system. AGEs content in collagen was quantitatively analyzed *via* FTIR under static (a), low-flow (b), and high-flow (b) conditions, with statistical results shown in (d)

多孔膜的厚度与孔径的比例会影响分子的渗透和质量传输速度^[26],且在机体内骨干骺端的静脉血管孔径和厚度也较接近^[27],因此本研究选择了与孔径更接近的厚度($9 \mu\text{m}$),以保持与骨微血管中相似的葡萄糖分子扩散情况。

微流控系统可通过提供 μL 级的动态培养条件对细胞或组织附近环境参数进行精准的时空控制,从而探究特定的生物物理学问题^[24],但现有大部分流动控制系统不能为微流控芯片提供长时稳定流剪力^[28]。目前主要使用德国的ibidi微流控系统对微流控芯片进行长时单向连续供液,如Hampel等^[29]利用ibidi系统对角膜上皮细胞施加 1.4 Pa 单向不间断流剪力 72 h ,Geng等^[30]对小鼠瓣膜间质细胞施加 0.5 Pa 单向不间断流剪力 24 h 。但ibidi系统通常为气动泵推动液体,存在培养液容易污染、需定期更换滤菌膜等缺点。本文研发的连续定向供液系统机械部分与细胞

培养相关部分分离,系统中与培养液直接接触的注射器、硅胶管、储液瓶、微流控芯片均可更换灭菌,且能够达到 μL 级的供液精度。此外,采用注射泵培养微流控芯片能够克服由于细胞生长引起的培养液流体力学性质变化带来的液体流动影响,在长时灌注培养时保持液体加载的精确性^[31],因此相较ibidi系统更具实验优势。本供液系统仍存在一些缺陷,由于系统采用外部注射泵为微流控芯片供液,而声、光、电、磁、热等驱动的集成在微流控芯片内部的微泵相对更为轻便^[32],因此本文研发的系统在硬件集成方面仍有待提升。

进一步对微流控芯片实验体系进行实验研究,验证了系统的各项性能。研究发现,对微流控芯片中的内皮细胞不加载或长时加载低流速液体时,内皮细胞生长状态良好,而长时加载高流速液体时,贴附在流道底部的内皮细胞显著减少。虽然本研究验证了实验

体系的生物相容性,但由于接种细胞密度及培养时间不足等原因,没有在芯片中形成连续完整的细胞层,未来将在应用研究中进一步改善细胞培养条件,以模拟血管屏障.此外,Yu等^[33]的研究同样发现,对内皮细胞施加低于0.83 Pa的剪切应力24 h后,内皮细胞能够紧贴芯片底部生长、形态保持卵圆,但对细胞施加大于1.67 Pa的微高剪切应力后,内皮细胞会脱离PDMS芯片.这可能是由于长时间高流剪力破坏了内皮细胞在疏水性聚合物表面上的贴附^[34].本研究初步未观察到剪切力对内皮细胞的取向性产生影响,推测这是由于本研究使用的是人脐静脉细胞株EA.hy926(该细胞株由于其生长曲线稳定且在一定程度上具备原代HUVECs所具有的生物特性^[35],而被广泛应用于在微流控芯片内构建血管的研究中^[36]).研究表明,EA.hy926内皮细胞系高表达CCM蛋白,这导致其取向不受剪切力影响^[37].

检测不同流速下葡萄糖分子跨多孔膜向胶原扩散的扩散-渗透系数后发现,葡萄糖分子沿垂直于液体流动方向上的扩散速率随流速增加而减小.此外,在低流速情况下,200 s后胶原内葡萄糖分子逐渐减少;而高流速情况下,胶原内葡萄糖分子含量则呈波动性变化,这可能与错流对物质跨膜渗透的影响有关^[38].培养3天后,检测胶原中AGEs含量发现高流量组生成的AGEs最少,说明流速增加会抑制葡萄糖向胶原扩散,影响其与胶原进行非酶交联.但本研究只检测了葡萄糖分子一维扩散速率,以垂直方向上的扩散-渗透系数表征了葡萄糖扩散至胶原内的快慢,而葡萄糖在骨基质内的扩散模式和分布情况极其复杂^[39],后续可深入探索葡萄糖分子三维扩散情况,完整描述其跨膜及在胶原中的扩散过程.

综上,设计研制了一款可用于模拟血管-骨基质交互作用的微流控芯片并搭载于双注射泵连续定向供液系统,成功在地面实验条件下实施精准定向加载不同流速的液体,实现了长时不间断液体培养(3天).通过检测不同流速下内皮细胞的生长状态、葡萄糖分子的扩散情况以及胶原AGEs的生成情况,初步验证了流速大小对骨胶原基质AGEs生成的假设.

在空间站实验资源稀缺的条件下,微流控芯片实验体系能够显著降低有效载荷和发射成本,已逐渐成为助力空间生命科学研究的重要技术支撑^[32].例如,Soni等^[40]利用微流控芯片测定了微重力对秀丽隐杆

线虫肌肉力量的影响,Mair等^[41]利用心脏微流控芯片研究了微重力对心肌细胞线粒体的不利影响,Lidberg等^[42]利用蠕动泵将含人血清和维生素D的培养基以 $0.5\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速加载于集成的肾小管上皮组织芯片培养体系48 h后,检测上皮细胞全转录组的变化.除此之外,美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)还资助了包括用于研究铜绿假单胞菌感染的肺-骨髓组织芯片、用于研究创伤后骨关节炎的软骨-骨-滑膜组织芯片、用于研究鼠伤寒沙门氏菌感染的肠道上皮黏膜芯片等,以开展空间站器官间交互作用研究^[43].本文地面验证实验结果证明,所开发的用于研究血管-骨基质交互的微流控芯片实验体系具有良好的生物相容性、液体流动稳定性、组织间交互性,具备深入开展空间站实验的良好技术储备,为推动进一步开展空间实验研究,从生物物理学角度深入分析微重力下骨胶原AGEs积聚的原因,从全新视角探索失重性骨丢失的发生机制奠定了坚实的技术基础.

参考文献

- [1] BUCKEY J C, THAMER S, LAN M M. Bone loss and kidney stone risk in weightlessness[J]. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 2023, **32**(2): 172-176
- [2] BARAN R, WEHLAND M, SCHULZ H, *et al.* Microgravity-related changes in bone density and treatment options: a systematic review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, **23**(15): 8650
- [3] GARNERO P. The role of collagen organization on the properties of bone[J]. *Calcified Tissue International*, 2015, **97**(3): 229-240
- [4] BALASUBRAMANIAN P, PRABHAKARAN M P, SIREESHA M, *et al.* Collagen in human tissues: structure, function, and biomedical implications from a tissue engineering perspective[M]//ABE A, KAUSCH H H, MÖLLER M, *et al.* Polymer Composites – Polyolefin Fractionation – Polymeric Peptidomimetics – Collagens. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012: 173-206
- [5] LIU C J, YANG X, MAO Y, *et al.* The alteration of advanced glycation end products and its potential role on bone loss under microgravity[J]. *Acta Astronautica*, 2023, **206**: 114-122
- [6] LIU C J, YANG X, WANG S H, *et al.* Preventing disused bone loss through inhibition of advanced glycation end products[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, **24**(5): 4953
- [7] PENG Y, WU S, LI Y S, *et al.* Type H blood vessels in bone modeling and remodeling[J]. *Theranostics*, 2020,

- 10(1): 426-436
- [8] WANG S H, YANG X, DING D, *et al.* The changes of bone vessels and their role in bone loss in tail-suspended rats[J]. *Acta Astronautica*, 2021, **189**: 368-378
 - [9] LIANG S, LING S K, DU R K, *et al.* The coupling of reduced type H vessels with unloading-induced bone loss and the protection role of Panax quinquefolium saponin in the male mice[J]. *Bone*, 2021, **143**: 115712
 - [10] ECKLY A, SCANDOLA C, OPRESCU A, *et al.* Megakaryocytes use in vivo podosome-like structures working collectively to penetrate the endothelial barrier of bone marrow sinusoids[J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2020, **18**(11): 2987-3001
 - [11] RAMASAMY S K, KUSUMBE A P, SCHILLER M, *et al.* Blood flow controls bone vascular function and osteogenesis[J]. *Nature Communications*, 2016, **7**(1): 13601
 - [12] LEUNG C M, DE HAAN P, RONALDSON-BOUCHARD K, *et al.* A guide to the organ-on-a-chip[J]. *Nature Reviews Methods Primers*, 2022, **2**(1): 33
 - [13] WANG Wenjia, PENG Zhao, LV Feixue, *et al.* Research progress of microfluidic chip cell perfusion culture technology and its application[J]. *Manned Spaceflight*, 2021, **27**(5): 646-654 (王文甲, 彭钊, 吕雪飞, 等. 微流控芯片细胞灌流培养技术及其应用研究进展 [J]. *载人航天*, 2021, **27**(5): 646-654)
 - [14] LIN L, CHUNG C K. PDMS microfabrication and design for microfluidics and sustainable energy application: review[J]. *Micromachines*, 2021, **12**(11): 1350
 - [15] MOORE S K, KLEIS S J. Characterization of a novel miniature cell culture device[J]. *Acta Astronautica*, 2008, **62**(10/11): 632-638
 - [16] MA T, SUN S X, LI B Q, *et al.* Piezoelectric peristaltic micropump integrated on a microfluidic chip[J]. *Sensors and Actuators A: Physical*, 2019, **292**: 90-96
 - [17] YIN Xiaojin. Analysis and discussion on quality safety control system and quality control results of medical injection and infusion pumps[J]. *China Plant Engineering*, 2024(5): 85-87 (殷小进. 医用注射、输液泵质量安全控制体系及质控结果的分析及探讨 [J]. *中国设备工程*, 2024(5): 85-87)
 - [18] CHOI B, CHOI J W, JIN H, *et al.* Condensed ECM-based nanofilms on highly permeable PET membranes for robust cell-to-cell communications with improved optical clarity[J]. *Biofabrication*, 2021, **13**(4): 045020
 - [19] BIXEL M G, KUSUMBE A P, RAMASAMY S K, *et al.* Flow dynamics and HSPC homing in bone marrow microvessels[J]. *Cell Reports*, 2017, **18**(7): 1804-1816
 - [20] POLACHECK W J, KUTYS M L, YANG J L, *et al.* A non-canonical Notch complex regulates adherens junctions and vascular barrier function[J]. *Nature*, 2017, **552**(7684): 258-262
 - [21] SROGA G E, STEPHEN S J, WANG B W, *et al.* Techniques for advanced glycation end product measurements for diabetic bone disease: pitfalls and future directions[J]. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity*, 2022, **29**(4): 333-342
 - [22] MUKWAYA A, JENSEN L, LAGALI N. Relapse of pathological angiogenesis: functional role of the basement membrane and potential treatment strategies[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2021, **53**(2): 189-201
 - [23] NAZARI S S, DOYLE A D, YAMADA K M. Mechanisms of basement membrane micro-perforation during cancer cell invasion into a 3D collagen gel[J]. *Gels*, 2022, **8**(9): 567
 - [24] PICOLLET-D'HAHAN N, ZUCHOWSKA A, LEMEUNIER I, *et al.* Multiorgan-on-a-chip: a systemic approach to model and decipher inter-organ communication[J]. *Trends in Biotechnology*, 2021, **39**(8): 788-810
 - [25] MANCINELLI E, ZUSHI N, TAKUMA M, *et al.* Porous polymeric nanofilms for recreating the basement membrane in an endothelial barrier-on-chip[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2024, **16**(10): 13006-13017
 - [26] MIRELES M, GABORSKI T R. Fabrication techniques enabling ultrathin nanostructured membranes for separations[J]. *Electrophoresis*, 2017, **38**(19): 2374-2388
 - [27] HUNTER W L, ARSENAULT A L. Vascular invasion of the epiphyseal growth plate: analysis of metaphyseal capillary ultrastructure and growth dynamics[J]. *The Anatomical Record*, 1990, **227**(2): 223-231
 - [28] SU H R, LI K X, LIU X, *et al.* Microfluidic chips for the endothelial biomechanics and mechanobiology of the vascular system[J]. *Biocell*, 2021, **45**(4): 797-811
 - [29] HAMPEL U, GARREIS F, BURGEMEISTER F, *et al.* Effect of intermittent shear stress on corneal epithelial cells using an *in vitro* flow culture model[J]. *The Ocular Surface*, 2018, **16**(3): 341-351
 - [30] GENG B C, CHEN X, CHI J Y, *et al.* Platelet membrane-coated alterbrassicene A nanoparticle inhibits calcification of the aortic valve by suppressing phosphorylation P65 NF- κ B[J]. *Theranostics*, 2023, **13**(11): 3781-3793
 - [31] QUINTARD C, TUBBS E, JONSSON G, *et al.* A microfluidic platform integrating functional vascularized organoids-on-chip[J]. *Nature Communications*, 2024, **15**(1): 1452
 - [32] ZHAO Y M, LV X F, LI X Q, *et al.* Microfluidic actuated and controlled systems and application for lab-on-chip in space life science[J]. *Space: Science & Technology*, 2023, **3**: 0008
 - [33] YU Z H, CHEN Y Q, LI J J, *et al.* A tempo-spatial controllable microfluidic shear-stress generator for in-vitro mimicking of the thrombus[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2024, **22**(1): 187
 - [34] JAIN P, RAUER S B, MÖLLER M, *et al.* Mimicking the natural basement membrane for advanced tissue engineering[J]. *Biomacromolecules*, 2022, **23**(8): 3081-3103
 - [35] LI Hui, LI Xiujuan, GULIREBA Xiayimaidan, *et al.* Comparative study of biological characteristics between primary human umbilical vein endothelial cells and human umbilic-

- al vein endothelial cell line[J]. *Journal of Xinjiang Medical University*, 2014, **37**(1): 36-39 (李慧, 李秀娟, 古力热巴·夏依买旦, 等. EA. HY926 人脐静脉内皮细胞株与原代细胞生物特性的比较研究 [J]. *新疆医科大学学报*, 2014, **37**(1): 36-39)
- [36] SUI C, ZILBERBERG J, LEE W. Microfluidic device engineered to study the trafficking of multiple myeloma cancer cells through the sinusoidal niche of bone marrow[J]. *Scientific Reports*, 2022, **12**(1): 1439
- [37] JILKOVA Z M, LISOWSKA J, MANET S, *et al*. CCM proteins control endothelial $\beta 1$ integrin dependent response to shear stress[J]. *Biology Open*, 2014, **3**(12): 1228-1235
- [38] TONOVA K, LAZAROVA M, DENCHEVA-ZARKOVA M, *et al*. Separation of glucose, other reducing sugars and phenolics from natural extract by nanofiltration: effect of pressure and cross-flow velocity[J]. *Chemical Engineering Research and Design*, 2020, **162**: 107-116
- [39] LU W Z, DUAN Y H, LI K, *et al*. Glucose uptake and distribution across the human skeleton using state-of-the-art total-body PET/CT[J]. *Bone Research*, 2023, **11**(1): 36
- [40] SONI P, ANUPOM T, LESANPEZESHKI L, *et al*. Microfluidics-integrated spaceflight hardware for measuring muscle strength of *Caenorhabditis elegans* on the International Space Station[J]. *npj Microgravity*, 2022, **8**(1): 50
- [41] MAIR D B, TSUI J H, HIGASHI T, *et al*. Spaceflight-induced contractile and mitochondrial dysfunction in an automated heart-on-a-chip platform[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2024, **121**(40): e2404644121
- [42] LIDBERG K A, JONES-ISAAC K, YANG J, *et al*. Modeling cellular responses to serum and vitamin D in microgravity using a human kidney microphysiological system[J]. *npj Microgravity*, 2024, **10**(1): 75
- [43] LOW L A, GIULIANOTTI M A. Tissue chips in space: modeling human diseases in microgravity[J]. *Pharmaceutical Research*, 2020, **37**(1): 8

作者简介



刘丛锦 女, 1997 年 9 月出生于河北省衡水市, 现为北京航空航天大学生物与医学工程学院博士研究生, 主要研究方向为失重性骨质疏松的发生机制研究。
E-mail: lcj734995754@163.com



杨肖 (通信作者) 女, 1985 年 10 月出生于内蒙古呼和浩特市, 北京航空航天大学生物与医学工程学院副教授, 博士生导师, 主要研究方向为航天生物医学工程、空间生命科学、失重性骨丢失机制、骨组织细胞的力学生物学与生物力学等。
E-mail: xiaoyang@buaa.edu.cn