



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I802457 B

(45) 公告日：中華民國 112 (2023) 年 05 月 11 日

(21) 申請案號：111124575

(22) 申請日：中華民國 111 (2022) 年 06 月 30 日

(51) Int. Cl. : C12M3/00 (2006.01)

(71) 申請人：國立清華大學 (中華民國) NATIONAL TSING HUA UNIVERSITY (TW)

新竹市光復路二段 101 號

(72) 發明人：穆宣佑 MU, HSUAN-YU (TW) ; 黃振煌 HUANG, JEN-HUANG (TW)

(74) 代理人：李世章；秦建譜

(56) 參考文獻：

TW 201604276A

CN 114369532A

US 2022/0089989A1

WO 2021/174018A1

審查人員：許嘉展

申請專利範圍項數：10 項 圖式數：18 共 50 頁

(54) 名稱

微環境模擬細胞培養系統

(57) 摘要

本發明提供一種微環境模擬細胞培養系統，包含一細胞培養晶片、一流體儲存裝置以及一流體驅動單元。細胞培養晶片包含一本體、一細胞培養腔室、二流體輸送口及一滴樣口。細胞培養腔室設置於本體內且具有一第一端部及一第二端部。二流體輸送口設置於本體上並分別連通細胞培養腔室。滴樣口設置於本體上並連通細胞培養腔室。流體儲存裝置管路連通細胞培養晶片。流體驅動單元管路連通流體儲存裝置與細胞培養晶片。藉此，可於細胞培養腔室中建立分子梯度，而具有臨床上的應用潛力。

The present disclosure provides a microenvironment-simulated cell culture system includes a cell culture chip, a fluid storage device and a fluid driving unit. The cell culture chip includes a mainbody, a cell culture chamber, two fluid delivery ports and a sample loading port. The cell culture chamber is disposed in the mainbody and has a first end portion and a second end portion. The two fluid delivery ports are disposed on the mainbody and are connected to the cell culture chamber, respectively. The sample loading port is disposed on the mainbody and is connected to the cell culture chamber. The fluid storage device is pipe-connected to the cell culture chip. The fluid driving unit is pipe-connected to the fluid storage device and the cell culture chip. Therefore, a molecular gradient can be established in the cell culture chamber, which has the potential for clinical application.

指定代表圖：

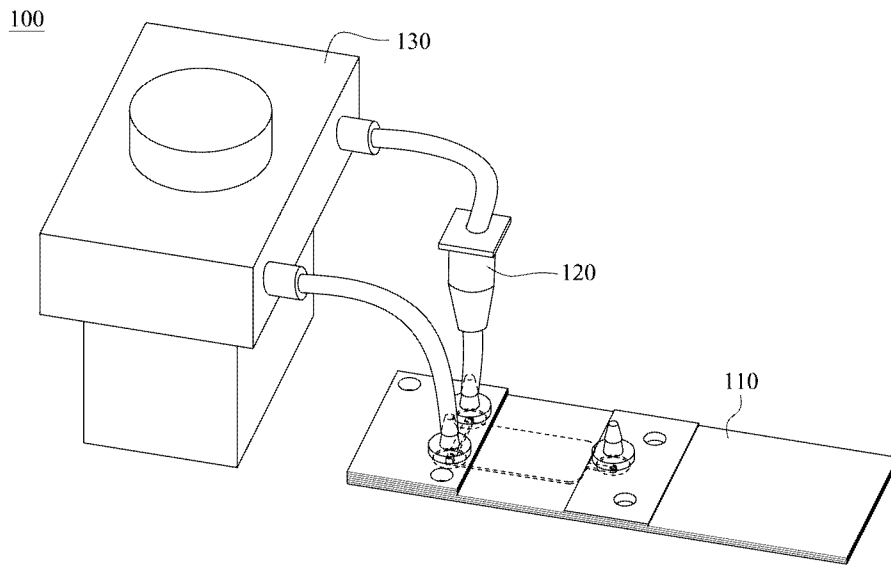
符號簡單說明：

100:微環境模擬細胞培養系統

110:細胞培養晶片

120:流體儲存裝置

130:流體驅動單元



第 1 圖



I802457

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】微環境模擬細胞培養系統

【英文發明名稱】 MICROENVIRONMENT-SIMULATED CELL CULTURE SYSTEM

## 【中文】

本發明提供一種微環境模擬細胞培養系統，包含一細胞培養晶片、一流體儲存裝置以及一流體驅動單元。細胞培養晶片包含一本體、一細胞培養腔室、二流體輸送口及一滴樣口。細胞培養腔室設置於本體內且具有一第一端部及一第二端部。二流體輸送口設置於本體上並分別連通細胞培養腔室。滴樣口設置於本體上並連通細胞培養腔室。流體儲存裝置管路連通細胞培養晶片。流體驅動單元管路連通流體儲存裝置與細胞培養晶片。藉此，可於細胞培養腔室中建立分子梯度，而具有臨床上的應用潛力。

## 【英文】

The present disclosure provides a microenvironment-simulated cell culture system includes a cell culture chip, a fluid storage device and a fluid driving unit. The cell culture chip includes a mainbody, a cell culture chamber, two fluid delivery ports and a sample loading port. The cell culture chamber is disposed in the mainbody and has a first end portion and a second end portion. The two fluid delivery ports are disposed on the mainbody and are connected to the cell culture chamber, respectively. The sample

loading port is disposed on the mainbody and is connected to the cell culture chamber. The fluid storage device is pipe-connected to the cell culture chip. The fluid driving unit is pipe-connected to the fluid storage device and the cell culture chip. Therefore, a molecular gradient can be established in the cell culture chamber, which has the potential for clinical application.

【指定代表圖】第 1 圖。

【代表圖之符號簡單說明】

1 0 0 : 微 環 境 模 擬 細 胞 培 養 系 統

1 1 0 : 細 胞 培 養 晶 片

1 2 0 : 流 體 儲 存 裝 置

1 3 0 : 流 體 驅 動 單 元

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】微環境模擬細胞培養系統

【英文發明名稱】MICROENVIRONMENT-SIMULATED CELL CULTURE SYSTEM

【技術領域】

【0001】 本發明是有關於一種細胞培養系統，特別是關於一種可模擬細胞生長微環境之微環境模擬細胞培養系統。

【先前技術】

【0002】 癌症對現代社會人們的生命安全帶來莫大的威脅，而如何有效地及早發現癌症並對其採取適當的治療方針，實為現行臨床上的重要研究目標。

【0003】 現行臨床上的抗癌藥物篩選多以二維細胞平面培養、三維細胞球培養或動物模型實驗來進行。然而，二維細胞培養僅能觀察癌細胞於平面的生長情形，並無法代表實際上複雜的腫瘤微環境，且腫瘤中的細胞多樣性與富含胞外基質等特徵皆無法進行模擬，導致藥物篩選的結果可能與實際藥理作用不盡相符。再者，以三維細胞球培養的方式雖可模擬腫瘤中的組織特徵，但實際上腫瘤中的氧氣、養分分布與免疫細胞的梯度在細胞球中並不易進行觀察，而以動物實驗的方式進行藥物篩選更需花費大量時間與成本，實驗的再現性也不如預期。

【0004】 因此，如何改良細胞體外培養裝置，有利於精確模擬腫瘤中細胞生長的微環境，以對不同類型的癌症進行抗癌藥物篩選或開發新的治療方針，遂成為現今業者與學者的努力目標。

#### 【發明內容】

【0005】 本發明之一態樣之一實施方式是在於提供一種微環境模擬細胞培養系統，包含一細胞培養晶片、一流體儲存裝置以及一流體驅動單元。細胞培養晶片包含一本體、一細胞培養腔室、二流體輸送口及一滴樣口。細胞培養腔室設置於本體內，其中細胞培養腔室具有一第一端部及一第二端部，且第一端部與第二端部係沿本體的一長軸而位於細胞培養腔室的兩側。二流體輸送口彼此分離地設置於本體上，且二流體輸送口分別連通細胞培養腔室。滴樣口設置於本體上，且滴樣口連通細胞培養腔室。流體儲存裝置管路連通細胞培養晶片，且流體儲存裝置透過一個流體輸送口而與細胞培養腔室連通。流體驅動單元管路連通流體儲存裝置與細胞培養晶片，且流體驅動單元透過另一個流體輸送口而與細胞培養腔室連通。其中，細胞培養腔室概呈一長條狀槽體，細胞培養腔室的二長邊平行本體的長軸，且細胞培養腔室的一短邊與細胞培養腔室的長邊的長度比為 1:1 至 1:4。

【0006】 依據前述之微環境模擬細胞培養系統，其中細胞培養晶片可為一多層微流道結構並可包含一第一基板、一第

二基板、一第三基板、一第四基板、一第五基板、一第六基板及一第七基板。其中，第一基板可具有一第一表面，所述之主流體輸送口彼此分離地開設於所述之第一表面，且第一基板、第二基板、第三基板與第五基板依序層疊以形成一流道，所述流道分別連通主流體輸送口與細胞培養腔室。其中，第四基板可具有一第二表面，所述之滴樣口開設於第二表面，且第四基板與第五基板層疊以形成一滴樣流道，所述滴樣流道連通滴樣口與細胞培養腔室。其中，第五基板、第六基板與第七基板依序層疊以形成所述之細胞培養腔室。

**【0007】** 依據前述之微環境模擬細胞培養系統，其中：第一基板、第二基板與第三基板可層疊以形成一第一覆蓋單元，第一覆蓋單元覆蓋第一端部；以及第四基板可覆蓋第二端部。

**【0008】** 依據前述之微環境模擬細胞培養系統，其中第一基板、第二基板、第三基板、第四基板、第五基板、第六基板及第七基板可由一不透氣材質製成。

**【0009】** 依據前述之微環境模擬細胞培養系統，其中所述之不透氣材質可為聚對苯二甲酸乙二酯 (polyethylene terephthalate)、丙烯酸纖維 (acrylic)、聚碳酸酯 (polycarbonate)、聚苯乙烯 (polystyrene) 或玻璃。

**【0010】** 依據前述之微環境模擬細胞培養系統，其中所述之不透氣材質可為一透明材質。

**【0011】** 依據前述之微環境模擬細胞培養系統，其中二個流

體輸送口可沿平行細胞培養腔室的短邊的方向而設置。

【0012】 依據前述之微環境模擬細胞培養系統，其中流體儲存裝置可用以儲存一細胞培養液，且流體驅動單元可用以持續驅動細胞培養液由流體儲存裝置經由其中一個流體輸送口傳輸至細胞培養腔室並經由另一個流體輸送口而由細胞培養腔室中移出。

【0013】 依據前述之微環境模擬細胞培養系統，其中所述之流體驅動單元可為一蠕動幫浦。

【0014】 依據前述之微環境模擬細胞培養系統，其中細胞培養腔室的短邊與細胞培養腔室的所述長邊的長度比可為1:2。

【0015】 藉此，本發明之微環境模擬細胞培養系統可將細胞培養於細胞培養腔室之三維空間中，同時透過細胞培養腔室概呈長條狀槽體的配置，可限制細胞培養腔室與外界進行分子交換的區域為第一端部，使得分子梯度可沿第一端部朝第二端部的方向而於細胞培養腔室中建立，以更精確地模擬臨床上腫瘤中的氧氣、養分分布與免疫細胞的梯度，進而可用於對不同類型的癌症進行抗癌藥物篩選與開發新的治療方針，並具有臨床上的應用潛力。

#### 【圖式簡單說明】

【0016】 為讓本發明之上述和其他目的、特徵、優點與實施例能更明顯易懂，所附圖式之說明如下：

第 1 圖係繪示本發明一實施方式之一實施例的微環境模擬

細胞培養系統的示意圖；

第 2 圖係繪示第 1 圖之微環境模擬細胞培養系統中細胞培養晶片的示意圖；

第 3 圖係繪示第 2 圖之細胞培養晶片的爆炸圖；

第 4 圖係呈現以實施例 1 至實施例 3 之微環境模擬細胞培養系統共同培養 4 T 1 細胞與 K - B A L B 細胞 2 4 小時後的西方墨點分析結果；

第 5 圖係呈現實施例 2 之微環境模擬細胞培養系統之細胞培養腔室的不同區域中缺氧訊號量化的分析結果；

第 6 圖係繪示施用不同藥物組合 2 4 小時後細胞培養腔室的不同區域中細胞存活率的分析結果；

第 7 A 圖係呈現試驗例 1 於細胞培養腔室的不同區域中的碘化丙啶染色結果圖；

第 7 B 圖係呈現試驗例 1 至試驗例 3 於細胞培養腔室的區域 4 的碘化丙啶染色結果圖；

第 8 圖係繪示試驗例 1 於細胞培養腔室之含氧區及缺氧區中 m R N A 表現的量化結果；

第 9 A 圖係繪示試驗例 1 與試驗例 3 於細胞培養腔室之含氧區中 m R N A 表現的量化結果；

第 9 B 圖係繪示試驗例 1 與試驗例 3 於細胞培養腔室之缺氧區中 m R N A 表現的量化結果；

第 1 0 A 圖係繪示控制組 2 與試驗例 4 至試驗例 6 於細胞培養腔室之含氧區中 K - B A L B 細胞的 m R N A 表現量化結果；

第 10 B 圖係繪示控制組 2 與試驗例 4 至試驗例 6 於細胞培養腔室之缺氧區中 K - B A L B 細胞的 m R N A 表現量化結果；

第 11 A 圖係繪示控制組 3、試驗例 7 與試驗例 8 於細胞培養腔室之含氧區中 4 T 1 細胞的 m R N A 表現量化結果；

第 11 B 圖係繪示控制組 3、試驗例 7 與試驗例 8 於細胞培養腔室之缺氧區中 4 T 1 細胞的 m R N A 表現量化結果；

第 12 A 圖係繪示細胞培養腔室之含氧區及缺氧區中表現 T i m - 3 受體之 T 細胞的百分比分析結果；

第 12 B 圖係繪示細胞培養腔室之含氧區及缺氧區中表現 C T L A - 4 受體之 T 細胞的百分比分析結果；

第 12 C 圖係繪示細胞培養腔室之含氧區及缺氧區中表現 P D - 1 受體之 T 細胞的百分比分析結果；

第 13 圖係呈現在培養 4 小時與 24 小時後細胞培養腔室的不同區域中的 T 細胞染色結果圖；

第 14 圖係呈現細胞培養腔室的不同區域中的凋亡訊號相關蛋白的染色結果圖；

第 15 A 圖係繪示以不同劑量之 a n t i - P D - 1 處理後於細胞培養腔室之缺氧區中的 T 細胞占總細胞量的分析結果；

第 15 B 圖係繪示以不同劑量之 a n t i - P D - 1 處理後於細胞培養腔室之含氧區中的 T 細胞占總細胞量的分析結果；

第 16 A 圖係繪示以不同劑量之 a n t i - P D - 1 處理後於細胞培養腔室之缺氧區中的細胞凋亡百分比分析結果；

第 16 B 圖係繪示以不同劑量之 a n t i - P D - 1 處理後於細胞

培養腔室之含氧區中的細胞凋亡百分比分析結果；

第 17 A 圖係繪示施用不同藥物後於細胞培養腔室之缺氧區中的 T 細胞占總細胞量的分析結果；

第 17 B 圖係繪示施用不同藥物後於細胞培養腔室之含氧區中的 T 細胞占總細胞量的分析結果；

第 18 A 圖係繪示施用不同藥物後於細胞培養腔室之缺氧區中的細胞凋亡百分比分析結果；以及

第 18 B 圖係繪示施用不同藥物後於細胞培養腔室之含氧區中的細胞凋亡百分比分析結果。

#### 【實施方式】

【0017】 下述將更詳細討論本發明各實施方式。然而，此實施方式可為各種發明概念的應用，可被具體實行在各種不同的特定範圍內。特定的實施方式是僅以說明為目的，且不受限於揭露的範圍。

【0018】 [本發明之微環境模擬細胞培養系統]

【0019】 請參照第 1 圖與第 2 圖，第 1 圖係繪示本發明一實施方式之一實施例的微環境模擬細胞培養系統 100 的示意圖，第 2 圖係繪示第 1 圖之微環境模擬細胞培養系統 100 中細胞培養晶片 110 的示意圖。微環境模擬細胞培養系統 100 包含一細胞培養晶片 110、一流體儲存裝置 120 以及一流體驅動單元 130。

【0020】 細胞培養晶片 110 包含一本體 111、一細胞培養腔室 112、二流體輸送口 113 及一滴樣口 114。

【0021】 細胞培養腔室 112 設置於本體 111 內。細胞培養腔室 112 具有一第一端部 1121 及一第二端部 1122，第一端部 1121 與第二端部 1122 沿本體 111 的一長軸（圖未標示）而位於細胞培養腔室 112 的兩側。具體而言，在第 1 圖的實施例中，本體 111 可呈一矩形，細胞培養腔室 112 則概呈一長條狀槽體，且第一端部 1121 與第二端部 1122 分別位於細胞培養腔室 112 中靠近本體 111 的兩端部。再者，如第 2 圖所示，細胞培養腔室 112 的二長邊係平行本體 111 的長軸，且細胞培養腔室 112 的短邊與長邊的長度比可為 1:1 至 1:4，以利於後續培養細胞時在細胞培養腔室 112 中建立分子梯度。較佳地，細胞培養腔室 112 的短邊與長邊的長度比可為 1:2。再者，細胞培養晶片 110 的高度可為 0.25 mm 至 0.75 mm，但本發明並不以此為限。

【0022】 二流體輸送口 113 彼此分離地設置於本體 111 上，且二流體輸送口 113 分別連通細胞培養腔室 112，以對細胞培養腔室 112 中的液體進行傳輸。再者，二流體輸送口 113 可沿平行細胞培養腔室 112 的短邊的方向而分離地設置，以利於後續流體循環的建立，但本發明並不以此為限。

【0023】 滴樣口 114 設置於本體 111 上，且滴樣口 114 連通細胞培養腔室 112，以將待培養的細胞輸送至細胞培養腔室 112 中。

【0024】 再請同時參照第 2 圖與第 3 圖，第 3 圖係繪示第 2

圖之細胞培養晶片 110 的爆炸圖。如第 3 圖所示，細胞培養晶片 110 為一多層微流道結構並包含一第一基板 1101、一第二基板 1102、一第三基板 1103、一第四基板 1104、一第五基板 1105、一第六基板 1106 及一第七基板 1107。

【0025】 如第 2 圖與第 3 圖所示，第一基板 1101 具有一第一表面 1108，二流體輸送口 113 彼此分離地開設於第一表面 1108（標示於第 3 圖），且第一基板 1101、第二基板 1102、第三基板 1103 與第五基板 1105 依序層疊以形成一流道 115（標示於第 2 圖），流道 115 分別連通二流體輸送口 113 與細胞培養腔室 112。再者，第一基板 1101、第二基板 1102 與第三基板 1103 層疊以形成一第一覆蓋單元 116，第一覆蓋單元 116 覆蓋第一端部 1121。藉此，透過二流體輸送口 113 開設於第一基板 1101 的第一表面 1108，且由第一基板 1101、第二基板 1102 與第三基板 1103 形成的第一覆蓋單元 116 覆蓋第一端部 1121 的方式，由其中一個流體輸送口 113 輸入之流體將可經由流道 115 而進入細胞培養腔室 112 並由另一個流體輸送口 113 輸出細胞培養腔室 112，以有效地模擬腫瘤與外界進行物質交換的方式，並可模擬腫瘤微環境與血管之交互作用，如血液與組織液流動時對腫瘤組織造成的剪力與正向力等，並具有優異的臨床應用潛力。

【0026】 再如第 2 圖與第 3 圖所示，第四基板 1104 具有一第二表面 1109（標示於第 3 圖），滴樣口 114 開設於第

二表面 1109，且第四基板 1104 與第五基板 1105 層疊以形成一滴樣流道 117（標示於第 2 圖），滴樣流道 117 連通滴樣口 114 與細胞培養腔室 112，且第四基板 1104 可覆蓋第二端部 1122 或鄰設於第二端部 1122 以覆蓋滴樣流道 117。藉此，透過滴樣口 114 開設於第四基板 1104 的第二表面 1109，且第四基板 1104 覆蓋第二端部 1122 或鄰設於第二端部 1122 的方式，包含待培養之細胞的細胞懸浮液可由滴樣口 114 輸入細胞培養腔室 112 中，以使細胞貼附於細胞培養腔室 112 之三維空間中生長。再者，若將胞外基質液（如膠原蛋白）與細胞懸浮液進行充分混合後再由滴樣口 114 輸入細胞培養腔室 112 中，細胞則可進一步於細胞培養腔室 112 之三維空間中生長，而模擬腫瘤中富含胞外基質且結締組織高度增生的現象，但本發明並不以此為限。

**【0027】** 再者，由第 2 圖與第 3 圖可見，第五基板 1105、第六基板 1106 與第七基板 1107 依序層疊以形成細胞培養腔室 112。藉此，可有效提升細胞培養晶片 110 的安裝裕度，並使其整體結構更加穩固。

**【0028】** 另外，第一基板 1101、第二基板 1102、第三基板 1103、第四基板 1104、第五基板 1105、第六基板 1106 及第七基板 1107 可由一不透氣材質製成。具體而言，透過細胞培養晶片 110 由多個以不透氣材質製成的基板層疊形成的方式，細胞培養腔室 112 能與晶片外部空間連通的區域僅有位於第一端部 1121 上之二個流體輸送口 113 與

位於第二端部 1122 上的滴樣口 114。而當待培養的細胞經由滴樣口 114 輸送至細胞培養腔室 112 中之後，滴樣口 114 將會被封閉，此時細胞培養腔室 112 能與外界進行物質交換的區域僅存二個流體輸送口 113，如此一來將有利於分子梯度於細胞培養腔室 112 中沿著第一端部 1121 朝第二端部 1122 的方向建立，並可在後續培養細胞的同時影響細胞的生長。再者，所述之不透氣材質可為聚對苯二甲酸乙二酯 (polyethylene terephthalate)、丙烯酸纖維 (acrylic)、聚碳酸酯 (polycarbonate)、聚苯乙烯 (polystyrene) 或玻璃，但本發明並不以此為限。另外，所述之不透氣材質亦可為一透明材質，以利於直接觀察而進一步提升使用的便利性。

**【0029】** 流體儲存裝置 120 管路連通細胞培養晶片 110，且流體儲存裝置 120 透過一流體輸送口 113 而與細胞培養腔室 112 連通。

**【0030】** 流體驅動單元 130 管路連通流體儲存裝置 120 與細胞培養晶片 110，且流體驅動單元 130 透過另一個流體輸送口 113 而與細胞培養腔室 112 連通。

**【0031】** 具體而言，流體儲存裝置 120 與流體驅動單元 130 分別透過不同的流體輸送口 113 而與細胞培養腔室 112 連通，其中流體儲存裝置 120 係用以儲存一細胞培養液，且流體驅動單元 130 係用以持續驅動細胞培養液由流體儲存裝置 120 經由一流體輸送口 113 傳輸至細胞培養腔室 112 並經由另一個流體輸送口 113 而由細胞培養腔室

112 中移出，並持續依循此路徑而循環流動，以在細胞培養晶片 110 中建立一動態的流體循環系統，進而模擬腫瘤與生物體內循環系統的交互作用而利於後續的應用。

【0032】 另外，流體驅動單元 130 可為一蠕動幫浦，由於蠕動幫浦是透過對其中設置之蠕動管（圖未繪示）交替進行擠壓和釋放來輸送流體，並將流體隔離在蠕動管中而不與外界氣體或蠕動幫浦的其他結構接觸，使其具有低污染並可連續輸送流體等優點，進而有利於本發明之微環境模擬細胞培養系統 100 在不被外界物質影響的前提下進行抗癌藥物篩選，並具有臨床上的應用潛力。

【0033】 藉此，本發明之微環境模擬細胞培養系統 100 透過將細胞培養於細胞培養晶片 110 的細胞培養腔室 112 之三維空間中的方式，可在短時間內建立三維生長的腫瘤模式，而透過細胞培養腔室 112 呈長條狀槽體且第一端部 1121 與第二端部 1122 分別設置於細胞培養腔室 112 的兩側的方式，可限制細胞培養腔室 112 與外界進行分子交換的區域為第一端部 1121。同時，流體驅動單元 130 所建立的流體循環系統連通第一端部 1121 並循環流動，使得細胞培養腔室 112 中的氧氣、養分等物質可於第一端部 1121 進行交換，並可在細胞培養腔室中建立沿第一端部 1121 朝第二端部 1122 的方向逐漸遞減的分子梯度，以更精確地模擬臨床上腫瘤中的氧氣、養分分布與免疫細胞的狀態，進而可對不同類型的癌症進行抗癌藥物篩選，或模擬體內免疫細胞對抗腫瘤之過程，並可大幅縮短習知進行

實驗所需的時間，同時具有高度的再現性而具有臨床上的應用潛力。

**【0034】** [實施例]

**【0035】** 以下將以本發明之微環境模擬細胞培養系統進行細胞培養，並搭配不同的藥物或免疫細胞進行試驗，以更詳細討論本發明之微環境模擬細胞培養系統模擬實際的腫瘤微環境的效果。然而，下述之實施例可為各種發明概念的應用，可被具體實行在各種不同的特定範圍內。特定的實施例是僅以說明為目的，且不受限於揭露的範圍。

**【0036】** 下述實驗係以本發明之微環境模擬細胞培養系統進行。在實驗中，細胞培養晶片的細胞培養腔室由第一端部朝第二端部的方向等分為含氧區及缺氧區，其中含氧區進一步由第一端部朝第二端部的方向等分為區域 1 與區域 2，而缺氧區同樣由第一端部朝第二端部的方向等分為區域 3 與區域 4，且氧氣的含量依序為：區域 1 > 區域 2 > 區域 3 > 區域 4。再者，含氧區與缺氧區之間的過渡區則是將區域 2 與區域 3 各自等分為二，並取區域 2 與區域 3 相鄰的兩個次區域定義為過渡區。

**【0037】** 以下實驗是分別以實施例 1 至實施例 3 之微環境模擬細胞培養系統共同培養 4 T 1 小鼠乳癌細胞株（以下稱為 4 T 1 細胞）與 K - B A L B 纖維母細胞株（以下稱為 K - B A L B 細胞），其中 4 T 1 細胞為一種三陰性乳癌細胞株，並常用以作為乳癌遠端轉移的研究模型及臨床藥物篩選模型，K - B A L B 細胞則為一種與 4 T 1 細胞同源之纖維

母細胞株。再者，用以培養 4 T 1 細胞的細胞培養液成分為包含 10% 的胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 及 1% 青黴素 / 鏈黴素溶液 (Penicillin/Streptomycin Solution, P/S) 之 89% 的高葡萄糖 DMEM 培養基，而用以培養 K - B A L B 細胞的細胞培養液成分為包含 10% 的小牛血清 (bovine calf serum) 及 1% 青黴素 / 鏈黴素溶液之 89% 的高葡萄糖 DMEM 培養基，並以 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的條件共同培養 4 T 1 細胞與 K - B A L B 細胞 24 小時之後，即可進行不同的分析試驗，以觀察 4 T 1 細胞與 K - B A L B 細胞在本發明之微環境模擬細胞培養系統的生長狀況及分析不同氧氣濃度區域之分子表現情形。

【0038】 再者，在下述實驗中，實施例 1 之微環境模擬細胞培養系統的細胞培養腔室的短邊與長邊的長度比為 1:4，實施例 2 之微環境模擬細胞培養系統的細胞培養腔室的短邊與長邊的長度比為 1:2，而實施例 3 之微環境模擬細胞培養系統的細胞培養腔室的短邊與長邊的長度比則為 1:1。另外，實施例 1 至實施例 3 之微環境模擬細胞培養系統的細胞培養晶片、流體儲存裝置與流體驅動單元皆與第 1 圖之微環境模擬細胞培養系統 100 相同，是以相同結構的配置或其細節請參前段所述，在此不再贅述。

【0039】 一、以本發明之微環境模擬細胞培養系統培養 4 T 1 細胞與 K - B A L B 細胞

【0040】 在實驗方面，首先將含有 4 T 1 細胞與 K - B A L B 細胞的細胞懸浮液分別由實施例 1 至實施例 3 之微環境模

擬細胞培養系統的滴樣口輸入細胞培養腔室中，而後將滴樣口封閉，以使 4T1 細胞與 K-BALB 細胞貼附於細胞培養腔室中並於其中進行生長。同時，流體驅動單元將持續驅動流體儲存裝置中的細胞培養液經由其中一個流體輸送口傳輸至細胞培養腔室並經由另一個流體輸送口而由細胞培養腔室中移出，並使細胞培養液持續依循此路徑而循環流動，以在細胞培養晶片中建立一動態的流體循環系統。接著，將實施例 1 至實施例 3 之微環境模擬細胞培養系統以 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的條件培養 24 小時，使 4T1 細胞與 K-BALB 細胞進行三維生長後即可進行後續分析。

【0041】 再者，以下實驗的方法與細節若為本領域習知之方法與細節，則不再另行贅述，特此先敘明。

【0042】 二、細胞培養晶片的氧氣濃度梯度分析

【0043】 本實驗是分析缺氧誘導因子 1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor 1-alpha，以下稱 HIF1- $\alpha$ )於實施例 1 至實施例 3 之微環境模擬細胞培養系統的不同區域的表現狀態。具體而言，HIF1- $\alpha$  是一種在細胞環境中的轉錄因子，其係於氧氣減少或缺氧的情況下被活化，若 HIF1- $\alpha$  的表現越多，代表該區域的氧氣濃度越低，是以本實驗則進一步以西方墨點法分析 HIF1- $\alpha$  在不同區域中之細胞的 HIF1- $\alpha$  蛋白質表現情形，並進一步以螢光染劑 Invitrogen™ Image-iT™ Red Hypoxia Reagent 對實施例 1 至實施例 3 微環境模擬細胞培養系統的細胞進行染色，進而評估細胞培養腔室中是否建立氧氣

濃度梯度。

【0044】 請參照第 4 圖與第 5 圖，第 4 圖係呈現以實施例 1 至實施例 3 之微環境模擬細胞培養系統（以下簡稱實施例 1、實施例 2 和實施例 3）共同培養 4 T 1 細胞與 K - B A L B 細胞 2 4 小時後的西方墨點分析結果，第 5 圖係呈現實施例 2 之微環境模擬細胞培養系統之細胞培養腔室的不同區域中缺氧訊號量化的分析結果。如第 4 圖所示，H I F 1 -  $\alpha$  在實施例 1 與實施例 2 的缺氧區中的表現增加，且以實施例 2 的表現差異最大。在第 5 圖中，螢光強度的定義是以含氧區為 1 進行計算的相對螢光強度，而如第 5 圖所示，缺氧訊號是沿著含氧區、過渡區至缺氧區而逐漸上升，並在缺氧區具有顯著上升的表現。

【0045】 由上述結果可知，氧氣的濃度梯度可於本發明之微環境模擬細胞培養系統的細胞培養晶片之細胞培養腔室中被建立，並有潛力提供於相關的臨床試驗之用。

【0046】 三、小分子藥物梯度對細胞毒性之影響分析

【0047】 本實驗是以實施例 2 之微環境模擬細胞培養系統共同培養 4 T 1 細胞與 K - B A L B 細胞，以觀察細胞培養液中的小分子藥物擴散至細胞培養腔室後對其中的 4 T 1 細胞與 K - B A L B 細胞的影響。在本實驗中，控制組 1 是以不含任何藥物的細胞培養液進行實驗，試驗例 1 是以包含吉西他濱（G e m c i t a b i n e）的細胞培養液進行實驗，試驗例 2 是以包含高倫替布（G a l u n i s e r t i b，T G F -  $\beta$  1 抑制劑）的細胞培養液進行實驗，試驗例 3 則是以包含吉西他濱與

高倫替布的細胞培養液進行實驗。詳細而言，吉西他濱是臨床上用以進行癌症化學療法的人工合成胞嘧啶核苷衍生物，其具有放射增敏作用強、毒性副作用較小的特點，且本實驗中進一步選用與抗藥性形成之生化途徑密切相關的細胞因子 TGF- $\beta$ 1 的抑制劑高倫替布，並將吉西他濱與高倫替布進行合併使用，以觀察細胞在兩種藥物合併使用後的狀態。

**【0048】** 在本實驗中，吉西他濱於細胞培養液的濃度為 100  $\mu$ M，高倫替布的濃度則為 100  $\mu$ M。同時，本實驗進一步分析 4T1 細胞與 K-BALB 細胞於不同區域的細胞存活率，並另行以碘化丙啶 (Propidium iodide) 進行染色，以觀察不同藥物組合對本發明之微環境模擬細胞培養系統的細胞培養晶片之細胞培養腔室中的 4T1 細胞與 K-BALB 細胞的影響。

**【0049】** 請參照第 6 圖，其係繪示施用不同藥物組合 24 小時後細胞培養腔室的不同區域中細胞存活率的分析結果。如第 6 圖所示，試驗例 1 的細胞存活率在區域 1 至區域 4 並無甚大差異，但試驗例 3 的細胞存活率在區域 1 至區域 4 皆明顯低於其他組別，其中在試驗例 3 中，區域 4 的細胞存活率明顯低於區域 1 的細胞存活率，顯示藥物的濃度梯度可於本發明之微環境模擬細胞培養系統的細胞培養晶片之細胞培養腔室中被建立，並可用以模擬藥物施用時腫瘤細胞的生長狀態。

**【0050】** 再請參照第 7A 圖與第 7B 圖，第 7A 圖係呈現試

驗例 1 於細胞培養腔室的不同區域中的碘化丙啶染色結果圖，第 7 B 圖係呈現試驗例 1 至試驗例 3 於細胞培養腔室的區域 4 的碘化丙啶染色結果圖。如第 7 A 圖所示，試驗例 1 的區域 1 與區域 2 的碘化丙啶訊號（紅色）明顯高於區域 3 與區域 4，顯示吉西他濱在區域 1 與區域 2 具有較高的濃度，並可誘發 4 T 1 細胞與 K - B A L B 細胞發生細胞凋亡（apoptosis），而細胞凋亡抑制的現象則在區域 3 與區域 4 之缺氧區域中上升。再者，如第 7 B 圖所示，當單獨比較試驗例 1 至試驗例 3 之氧氣濃度最低之區域 4 的碘化丙啶訊號強度時，在第 6 圖中具有較佳藥物治療表現的試驗例 3 的碘化丙啶訊號強度明顯大於其他組別，顯示不同藥物組合仍可在細胞培養腔室中具有不同氧氣濃度的區域對細胞產生不同影響，且上述實驗的結果與臨床上腫瘤微環境的表現高度相似，顯示本發明之微環境模擬細胞培養系統具有用於研究腫瘤微環境中藥物與氧氣梯度間交互作用之優異能力，而具有優異的臨床應用潛力。

【0051】 再者，請同時參照第 8 圖、第 9 A 圖與第 9 B 圖，第 8 圖係繪示試驗例 1 於細胞培養腔室之含氧區及缺氧區中 m R N A 表現的量化結果，第 9 A 圖係繪示試驗例 1 與試驗例 3 於細胞培養腔室之含氧區中 m R N A 表現的量化結果，而第 9 B 圖係繪示試驗例 1 與試驗例 3 於細胞培養腔室之缺氧區中 m R N A 表現的量化結果。詳細而言，本實驗同時以 q P C R 方式測量試驗例 1 與試驗例 3 之細胞培養腔室中不同氧氣濃度區域中與細胞凋亡和促抗藥性相關的蛋

白質之 mRNA 的表現情形，其中 BCL2 為一種凋亡調節蛋白，其可通過抑制或誘導細胞凋亡來調節細胞死亡，而 SIRT1 則可去除蛋白質上的乙醯基團而使藥物失活。

【0052】如同第 8 圖所示，試驗例 1 的 BCL2 和 SIRT1 的 mRNA 表現在缺氧區皆較含氧區為高，然而，如第 9A 圖與第 9B 圖所示，在輔以高倫替布治療後，BCL2 和 SIRT1 的 mRNA 表現不論在含氧區與缺氧區皆明顯下降，顯示本發明之微環境模擬細胞培養系統確實可用於模擬小分子藥物對腫瘤的影響，並與現行臨床的研究結果相符而具有相關市場的應用潛力。

#### 【0053】 四、免疫或發炎反應相關蛋白質表現狀態分析

【0054】本實驗是以實施例 2 之微環境模擬細胞培養系統共同培養 4T1 細胞與 K-BALB 細胞，以觀察細胞培養腔室的不同區域中與免疫或發炎反應相關的蛋白質之 mRNA 的表現情形。在本實驗中，控制組 2 是以不含任何藥物的細胞培養液培養 K-BALB 細胞後進行分析；試驗例 4 是以不含任何藥物的細胞培養液共同培養 4T1 細胞與 K-BALB 細胞後，以磁珠分離 K-BALB 細胞進行分析；試驗例 5 是以包含濃度為 50  $\mu$ M 的高倫替布的細胞培養液共同培養 4T1 細胞與 K-BALB 細胞後，以磁珠分離 K-BALB 細胞進行分析；以及試驗例 6 是以包含濃度為 50  $\mu$ M 的 AZD-1480 (JAK1/2 抑制劑) 的細胞培養液共同培養 4T1 細胞與 K-BALB 細胞後，以磁珠分離 K-BALB 細胞進行分析。再者，控制組 3 是以不含任何藥

物的細胞培養液共同培養 4T1 細胞與 K-BALB 細胞後，以磁珠分離 4T1 細胞進行分析；試驗例 7 是以包含濃度為 50  $\mu\text{M}$  的高倫替布的細胞培養液共同培養 4T1 細胞與 K-BALB 細胞後，以磁珠分離 4T1 細胞進行分析；以及試驗例 8 是以包含濃度為 50  $\mu\text{M}$  的 AZD-1480 的細胞培養液共同培養 4T1 細胞與 K-BALB 細胞後，以磁珠分離 4T1 細胞進行分析。在培養 24 小時後，進一步測量控制組 2、控制組 3 與試驗例 4 至試驗例 8 之細胞培養腔室中含氧區與缺氧區中與纖維化或發炎相關的蛋白質之 mRNA 的表現情形。

**【0055】** 具體而言，白血病抑制因子 (Leukemia inhibitory factor，以下稱「LIF」) 是一種屬於白細胞介素 6 類細胞因子 (interleukin 6 class cytokine) 的細胞因子，其通過抑制分化 (inhibiting differentiation) 來影響細胞；變形生長因子- $\beta 1$  (transforming growth factor beta one，以下稱「TGF- $\beta 1$ 」) 可調控細胞生長、細胞增殖、細胞分化和細胞凋亡等發生與否；細胞程式死亡配體 1 (programmed cell death ligand 1，以下稱「PD-L1」) 為體內免疫作用啟動與否的重要調節蛋白；膠原蛋白 I 型 (collagen I，以下稱「col-1」) 則與腫瘤分化或發炎反應有關；以及白介素-1 (interleukin-1，以下稱「IL-1」) 則在控制免疫和發炎反應中具有重要的作用。

**【0056】** 請參照第 10A 圖、第 10B 圖、第 11A 圖與第 11B

圖，第 10A 圖係繪示控制組 2 與試驗例 4 至試驗例 6 於細胞培養腔室之含氧區中 K-BALB 細胞的 mRNA 表現量化結果，第 10B 圖係繪示控制組 2 與試驗例 4 至試驗例 6 於細胞培養腔室之缺氧區中 K-BALB 細胞的 mRNA 表現量化結果，第 11A 圖係繪示控制組 3、試驗例 7 與試驗例 8 於細胞培養腔室之含氧區中 4T1 細胞的 mRNA 表現量化結果，而第 11B 圖係繪示控制組 3、試驗例 7 與試驗例 8 於細胞培養腔室之缺氧區中 4T1 細胞的 mRNA 表現量化結果。在第 10A 圖、第 10B 圖、第 11A 圖與第 11B 圖中，「\*」代表統計數據為對比控制組 2 或控制組 3 的數據，「#」則代表統計數據為對比試驗例 4 的數據。

【0057】 詳細而言，當以實施例 2 之微環境模擬細胞培養系統單獨培養 K-BALB 細胞時，於細胞培養腔室之缺氧區會表現部分纖維化與發炎訊號，而當以實施例 2 之微環境模擬細胞培養系統單獨培養 4T1 細胞時，於細胞培養腔室之缺氧區會表現發炎訊號，然而，如第 10A 圖與第 10B 圖所示，在以磁珠分離方式篩選試驗例 4 至試驗例 6 的 K-BALB 細胞進行 qPCR 分析後，試驗例 4 的 K-BALB 細胞在細胞培養腔室之含氧區與缺氧區的 LIF、TGF- $\beta$ 1、PD-L1 與 col-1 的 mRNA 表現相較於控制組 2 皆有上升現象，並隨著高倫替布或 AZD-1480 的施用而下降且有不同的表現量。再如第 11A 圖與第 11B 圖所示，在以磁珠分離方式篩選試驗例 7 與試驗例 8 的 4T1 細胞進行 qPCR 分析後，試驗例 7 與試驗例 8 在細胞培養腔室之

含氧區與缺氧區的 4T1 細胞之 IL-1 與 PD-L1 的 mRNA 表現相較於控制組 3 皆明顯下降，但 TGF- $\beta$ 1 的表現則與控制組 3 相當，顯示本發明之微環境模擬細胞培養系統在細胞培養腔室之含氧區與缺氧區中的細胞可有不同免疫或發炎反應的表現，並可用於模擬藥物對腫瘤的影響而具有相關市場的應用潛力。

**【0058】** 五、細胞培養晶片中 T 細胞的含量與表現分析

**【0059】** 本實驗是以實施例 2 之微環境模擬細胞培養系統共同培養 4T1 細胞、K-BALB 細胞與表現 CD3 的 T 細胞，以分析 T 細胞在本發明之微環境模擬細胞培養系統的存活狀態，並同時分析本發明之微環境模擬細胞培養系統用於免疫治療研究的可行性。在本實驗中，T 細胞是經由流體驅動單元驅動之細胞培養液而進入細胞培養腔室中，以模擬實際腫瘤生長時 T 細胞由循環系統進入腫瘤中的狀態，並在培養 24 小時後分析與 T 細胞耗竭相關之 T 細胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3 (T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-3，以下稱「Tim-3」)、細胞毒性 T 淋巴細胞相關抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4，以下稱「CTLA-4」) 與細胞程式性死亡蛋白-1 (programmed cell death protein-1，以下稱「PD-1」) 等受體的表現情形，並同時分析細胞培養腔室中不同區域中與細胞凋亡相關的 Caspase 3/7 蛋白的表現情形。

**【0060】** 請參照第 12A 圖、第 12B 圖與第 12C 圖，第 12A

圖係繪示細胞培養腔室之含氧區及缺氧區中表現 Tim-3 受體之 T 細胞的百分比分析結果，第 12B 圖係繪示細胞培養腔室之含氧區及缺氧區中表現 CTLA-4 受體之 T 細胞的百分比分析結果，而第 12C 圖係繪示細胞培養腔室之含氧區及缺氧區中表現 PD-1 受體之 T 細胞的百分比分析結果。具體而言，由於 T 細胞是經由被流體驅動單元驅動之細胞培養液而進入細胞培養腔室中，在預先分析 T 細胞於含氧區與缺氧區的浸潤量可知，T 細胞於含氧區的總量明顯高於缺氧區的 T 細胞總量，而如同第 12A 圖至第 12C 圖所示，表現 Tim-3 受體、CTLA-4 受體與 PD-1 受體之 T 細胞於缺氧區的細胞總量占比皆顯著上升，顯示免疫治療於缺氧區之抗性可透過本發明之微環境模擬細胞培養系統而進行觀察。

**【0061】** 再請參照第 13 圖與第 14 圖，第 13 圖係呈現在培養 4 小時與 24 小時後細胞培養腔室的不同區域中的 T 細胞染色結果圖，第 14 圖係呈現細胞培養腔室的不同區域中的凋亡訊號相關蛋白的染色結果圖。如第 13 圖所示，在培養 4 小時與 24 小時之後，T 細胞訊號（紅色）由細胞培養腔室的區域 1 至區域 4 逐漸遞減，顯示本發明之微環境模擬細胞培養系統的細胞培養晶片在不同時間點皆可有效模擬免疫細胞於實際腫瘤環境中的梯度。再如第 14 圖所示，在含有 T 細胞的情形下，Caspase 3/7 蛋白的表現量同樣由細胞培養腔室的區域 1 至區域 4 逐漸遞減，顯示細胞凋亡的情形於缺氧區被抑制，而在未含有 T 細胞的情形

下，細胞培養腔室的區域 1 至區域 4 的 Caspase 3/7 蛋白表現量大抵相同，顯示本發明之微環境模擬細胞培養系統有潛力應用於癌症的免疫療法之研究，並具有優異的臨床應用潛力。

**【0062】** 六、免疫周期檢查點抑制劑與抗癌藥物治療的效果分析

**【0063】** 本實驗是以實施例 2 之微環境模擬細胞培養系統共同培養 4T1 細胞、K-BALB 細胞與表現 CD3 的 T 細胞，以觀察 4T1 細胞、K-BALB 細胞與 T 細胞在施用免疫周期檢查點抑制劑與抗癌藥物治療後的存活狀態，進而據此分析本發明之微環境模擬細胞培養系統用於免疫治療研究的可行性。

**【0064】** 在本實驗中，控制組 4 是以不含任何藥物的細胞培養液進行實驗，試驗例 9 是以濃度為 100 ng/mL 之低劑量 anti-PD-1 處理細胞培養腔室中的細胞，試驗例 10 是以濃度為 1000 ng/mL 之高劑量 anti-PD-1 處理細胞培養腔室中的細胞。再者，控制組 5 是以不含任何藥物的細胞培養液進行實驗，試驗例 11 是以濃度為 1000 ng/mL 之 anti-PD-1 處理細胞培養腔室中的細胞，試驗例 12 是以濃度為 50  $\mu$ M 之高倫替布處理細胞培養腔室中的細胞，而試驗例 13 是以濃度為 1000 ng/mL 之 anti-PD-1 與濃度為 50  $\mu$ M 之高倫替布共同處理細胞培養腔室中的細胞。

**【0065】** 請參照第 15 A 圖、第 15 B 圖、第 16 A 圖與第 16 B

圖，第 15 A 圖係繪示以不同劑量之 anti-PD-1 處理後於細胞培養腔室之缺氧區中的 T 細胞占總細胞量的分析結果，第 15 B 圖係繪示以不同劑量之 anti-PD-1 處理後於細胞培養腔室之含氧區中的 T 細胞占總細胞量的分析結果，第 16 A 圖係繪示以不同劑量之 anti-PD-1 處理後於細胞培養腔室之缺氧區中的細胞凋亡百分比分析結果，而第 16 B 圖係繪示以不同劑量之 anti-PD-1 處理後於細胞培養腔室之含氧區中的細胞凋亡百分比分析結果。

**【0066】** 如第 15 A 圖與第 15 B 圖所示，在施用高劑量之 anti-PD-1 後，試驗例 9 之 T 細胞於細胞培養腔室中的缺氧區的浸潤量大於試驗例 10 之 T 細胞浸潤量，而在含氧區中，無論是施用低劑量之 anti-PD-1 或高劑量之 anti-PD-1，T 細胞於細胞培養腔室中的浸潤量與控制組 4 皆未有顯著差異。然而，如同第 16 A 圖與第 16 B 圖所示，試驗例 9 與試驗例 10 中發生細胞凋亡的細胞在細胞培養腔室之缺氧區與含氧區中的占比皆大於控制組 4，其中又以試驗例 10 的凋亡細胞在缺氧區與含氧區中的占比最高，顯示本發明之微環境模擬細胞培養系統有潛力應用於癌症的免疫療法之研究。

**【0067】** 再者，請參照第 17 A 圖、第 17 B 圖、第 18 A 圖與第 18 B 圖，第 17 A 圖係繪示施用不同藥物後於細胞培養腔室之缺氧區中的 T 細胞占總細胞量的分析結果，第 17 B 圖係繪示施用不同藥物後於細胞培養腔室之含氧區中的 T 細胞占總細胞量的分析結果，第 18 A 圖係繪示施用不

同藥物後於細胞培養腔室之缺氧區中的細胞凋亡百分比分析結果，而第 18 B 圖係繪示施用不同藥物後於細胞培養腔室之含氧區中的細胞凋亡百分比分析結果。

【0068】 如第 17 A 圖與第 17 B 圖所示，試驗例 13 在缺氧區中具有最高的 T 細胞浸潤量，但在含氧區中，試驗例 11 至試驗例 13 的 T 細胞浸潤量皆與控制組 5 差異不大。然而，如同第 18 A 圖與第 18 B 圖所示，試驗例 11 至試驗例 13 中發生細胞凋亡的 4 T 1 細胞在細胞培養腔室之缺氧區與含氧區中的占比皆大於控制組 4，其中又以試驗例 13 的凋亡細胞占比最高，並可據此得知 anti-PD-1 與高倫替布對 4 T 1 細胞具有優異的協同抑制效果。

【0069】 綜上所述，本發明之微環境模擬細胞培養系統不僅可將細胞培養於細胞培養腔室之三維空間中而模擬腫瘤中遠離循環系統之區域的缺氧狀態，以供藥物篩選或免疫制量試驗之用，並可透過供給膠原蛋白等胞外基質液的方式培養細胞而模擬腫瘤中富含胞外基質且結締組織高度增生的現象。因此，本發明之微環境模擬細胞培養系統可用於對不同類型的癌症進行抗癌藥物篩選與相關治療的試驗，並具有臨床上的應用潛力。

【0070】 雖然本發明已以實施方式揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

## 【符號說明】

## 【0071】

1 0 0 : 微 環 境 模 擬 細 胞 培 養 系 統

1 1 0 : 細 胞 培 養 晶 片

1 1 0 1 : 第 一 基 板

1 1 0 2 : 第 二 基 板

1 1 0 3 : 第 三 基 板

1 1 0 4 : 第 四 基 板

1 1 0 5 : 第 五 基 板

1 1 0 6 : 第 六 基 板

1 1 0 7 : 第 七 基 板

1 1 0 8 : 第 一 表 面

1 1 0 9 : 第 二 表 面

1 1 1 : 本 體

1 1 2 : 細 胞 培 養 腔 室

1 1 2 1 : 第 一 端 部

1 1 2 2 : 第 二 端 部

1 1 3 : 流 體 輸 送 口

1 1 4 : 滴 樣 口

1 1 5 : 流 道

1 1 6 : 第 一 覆 蓋 單 元

1 1 7 : 滴 樣 流 道

1 2 0 : 流 體 儲 存 裝 置

1 3 0 : 流 體 驅 動 單 元

## 【發明申請專利範圍】

【請求項 1】一種微環境模擬細胞培養系統，包含：

一細胞培養晶片，包含：

一本體；

一細胞培養腔室，設置於該本體內，其中該細胞培養腔室具有一第一端部及一第二端部，且該第一端部與該第二端部係沿該本體的一長軸而位於該細胞培養腔室的兩側；

二流體輸送口，彼此分離地設置於該本體上，且二該流體輸送口分別連通該細胞培養腔室；及

一滴樣口，設置於該本體上，且該滴樣口連通該細胞培養腔室；

一流體儲存裝置，管路連通該細胞培養晶片，且該流體儲存裝置透過一該流體輸送口而與該細胞培養腔室連通；  
以及

一流體驅動單元，管路連通該流體儲存裝置與該細胞培養晶片，且該流體驅動單元透過另一該流體輸送口而與該細胞培養腔室連通；

其中，該細胞培養腔室概呈一長條狀槽體，該細胞培養腔室的二長邊平行該本體的該長軸，且該細胞培養腔室的一短邊與該細胞培養腔室的一該長邊的長度比為 1:1 至 1:4。

【請求項 2】如請求項 1 所述之微環境模擬細胞培養系

統，其中該細胞培養晶片為一多層微流道結構並包含一第一基板、一第二基板、一第三基板、一第四基板、一第五基板、一第六基板及一第七基板；

其中，該第一基板具有一第一表面，二該流體輸送口彼此分離地開設於該第一表面，且該第一基板、該第二基板、該第三基板與該第五基板依序層疊以形成一流道，該流道分別連通二該流體輸送口與該細胞培養腔室；

其中，該第四基板具有一第二表面，該滴樣口開設於該第二表面，且該第四基板與該第五基板層疊以形成一滴樣流道，該滴樣流道連通該滴樣口與該細胞培養腔室；以及

其中，該第五基板、該第六基板與該第七基板依序層疊以形成該細胞培養腔室。

**【請求項 3】**如請求項 2 所述之微環境模擬細胞培養系統，其中：

該第一基板、該第二基板與該第三基板層疊以形成一第一覆蓋單元，該第一覆蓋單元覆蓋該第一端部；以及

該第四基板覆蓋該第二端部。

**【請求項 4】**如請求項 2 所述之微環境模擬細胞培養系統，其中該第一基板、該第二基板、該第三基板、該第四基板、該第五基板、該第六基板及該第七基板由一不透氣材質製成。

【請求項 5】如請求項 4 所述之微環境模擬細胞培養系統，其中該不透氣材質為聚對苯二甲酸乙二酯 (polyethylene terephthalate)、丙烯酸纖維 (acrylic)、聚碳酸酯 (polycarbonate)、聚苯乙烯 (polystyrene) 或玻璃。

【請求項 6】如請求項 4 所述之微環境模擬細胞培養系統，其中該不透氣材質為一透明材質。

【請求項 7】如請求項 1 所述之微環境模擬細胞培養系統，其中該流體輸送口係沿平行該細胞培養腔室的該短邊的方向而設置。

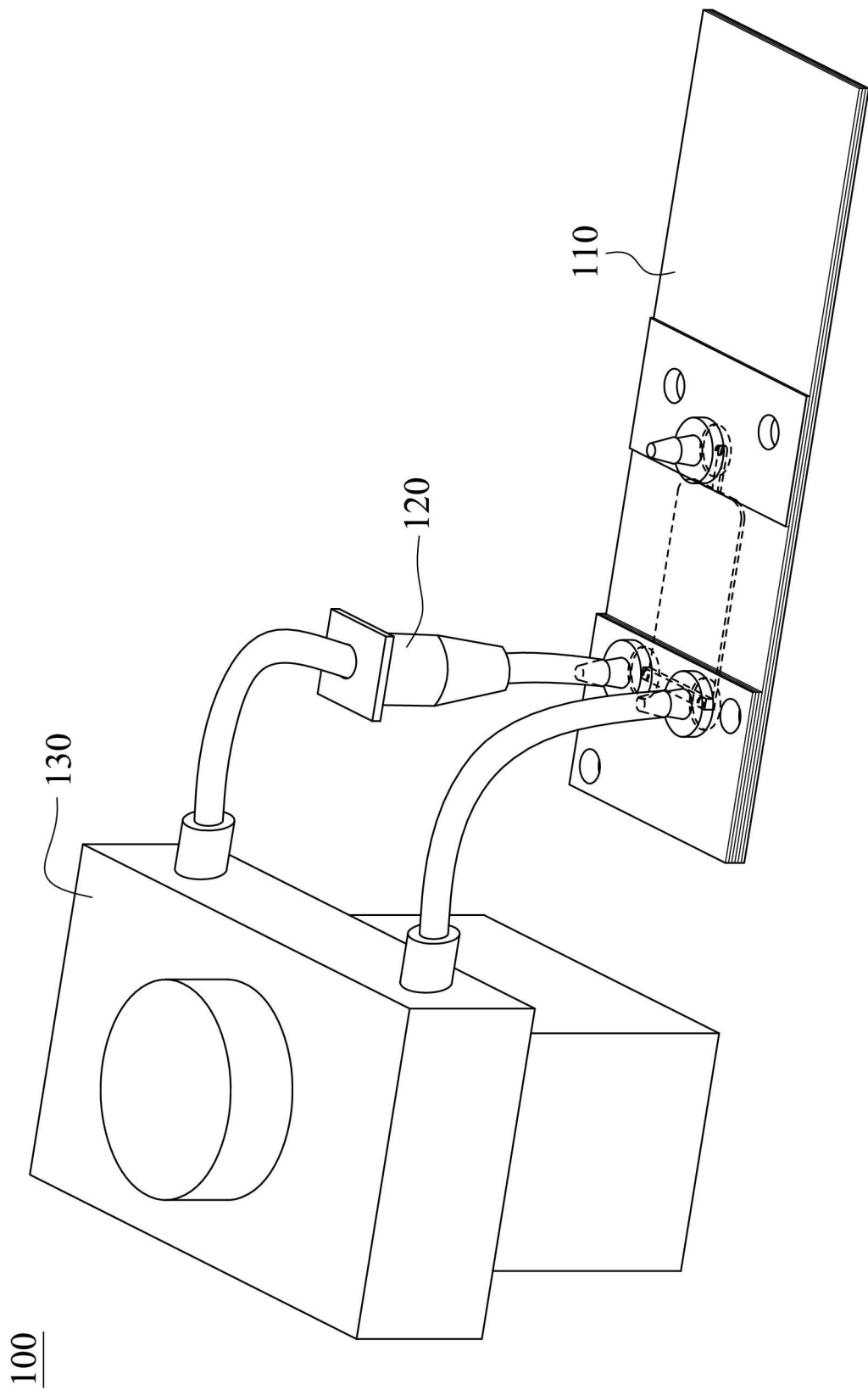
【請求項 8】如請求項 1 所述之微環境模擬細胞培養系統，其中該流體儲存裝置用以儲存一細胞培養液，且該流體驅動單元係用以持續驅動該細胞培養液由該流體儲存裝置經由該一流體輸送口傳輸至該細胞培養腔室並經由該另一流體輸送口而由細胞培養腔室中移出。

【請求項 9】如請求項 8 所述之微環境模擬細胞培養系統，其中該流體驅動單元為一蠕動幫浦。

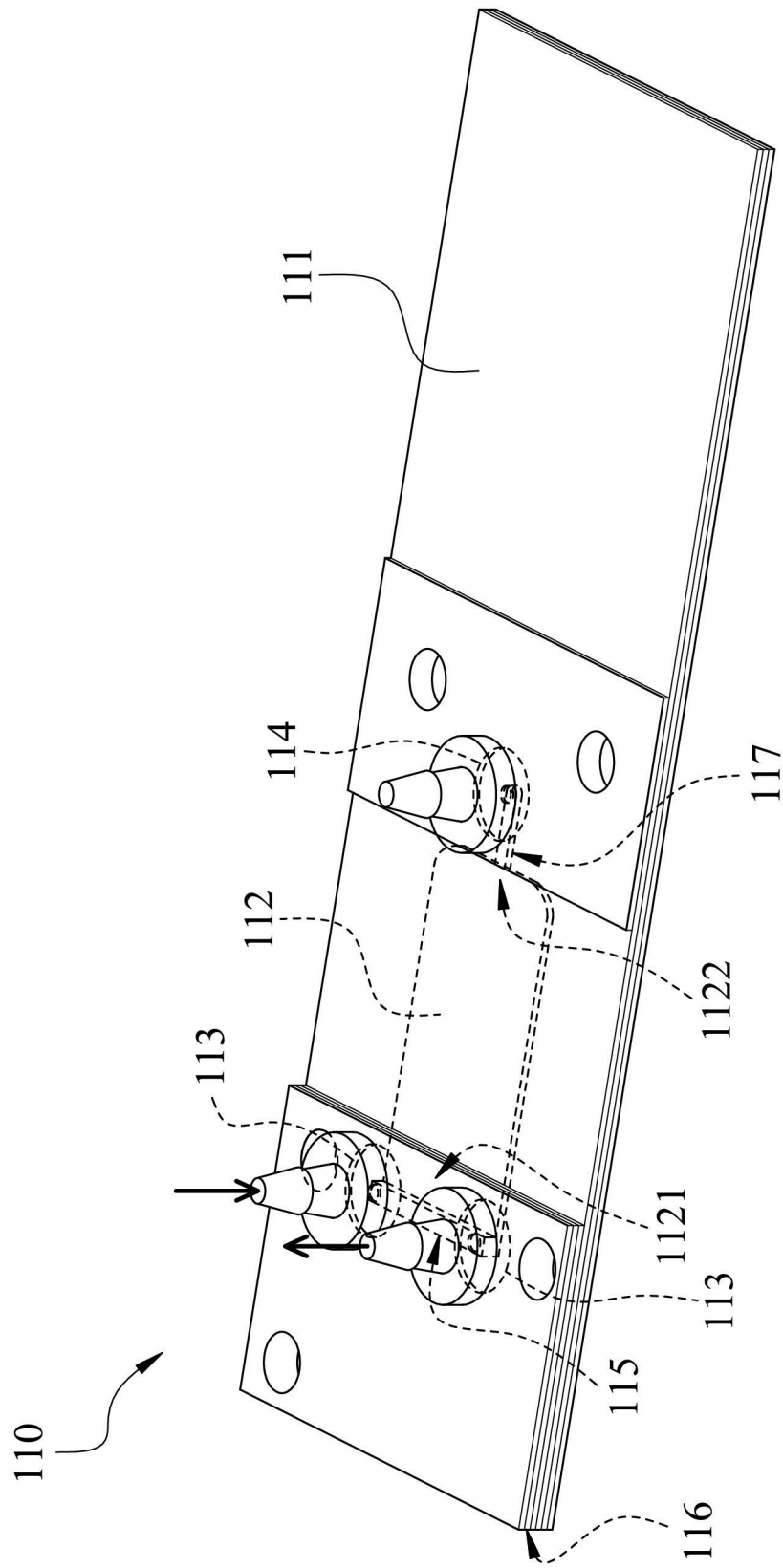
【請求項 10】如請求項 1 所述之微環境模擬細胞培養系統，其中該細胞培養腔室的該短邊與該細胞培養腔室的

該一長邊的長度比為 1:2。

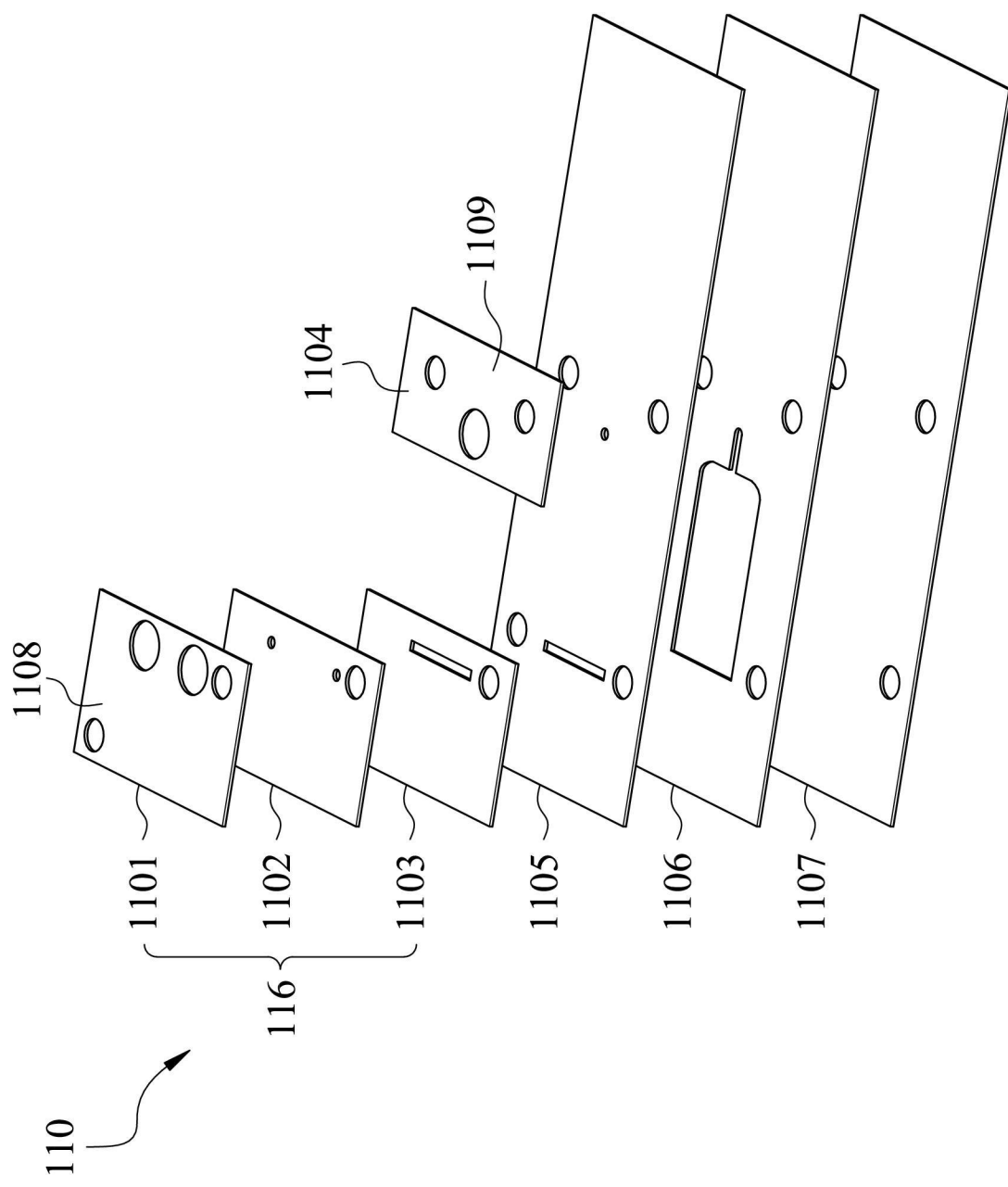
【發明圖式】



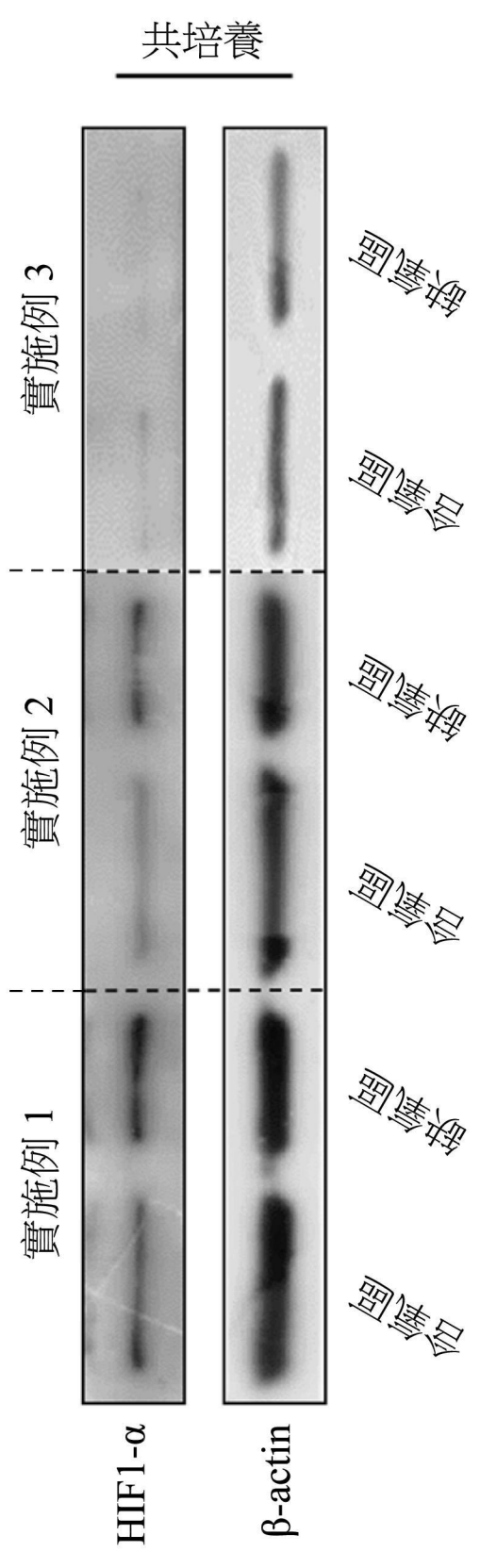
第 1 圖



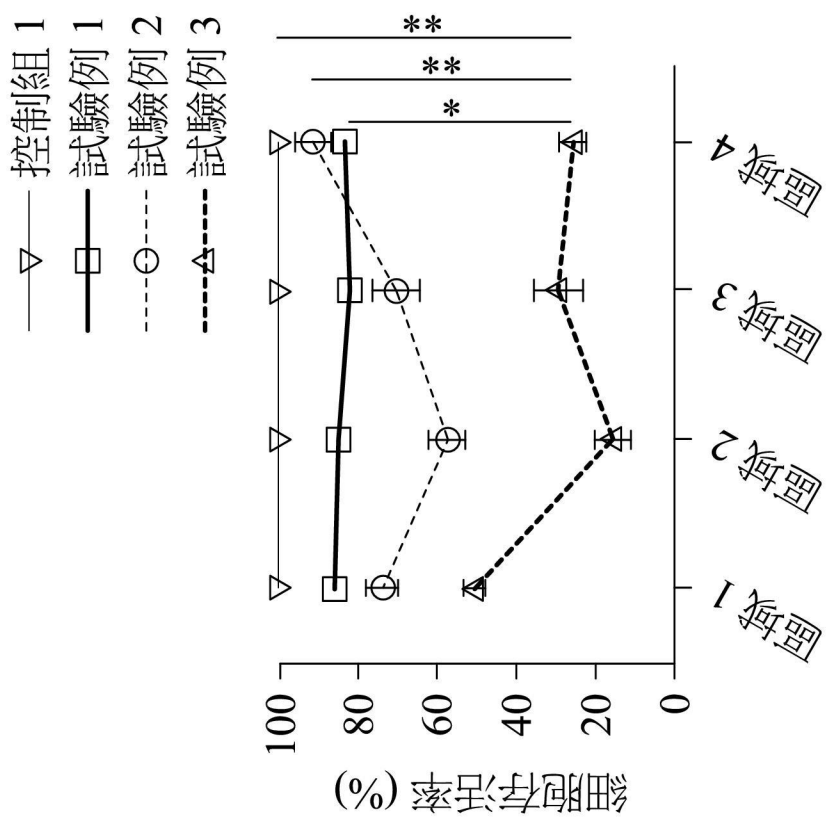
第2圖



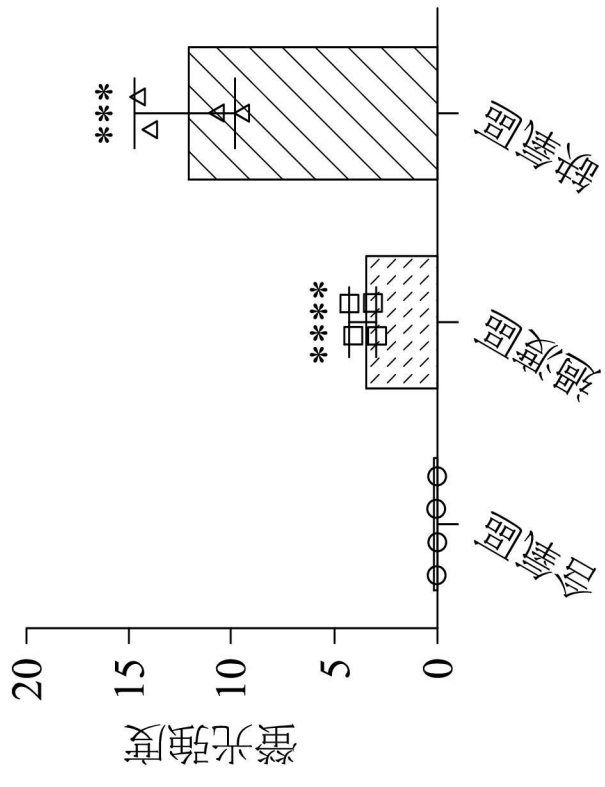
第3圖



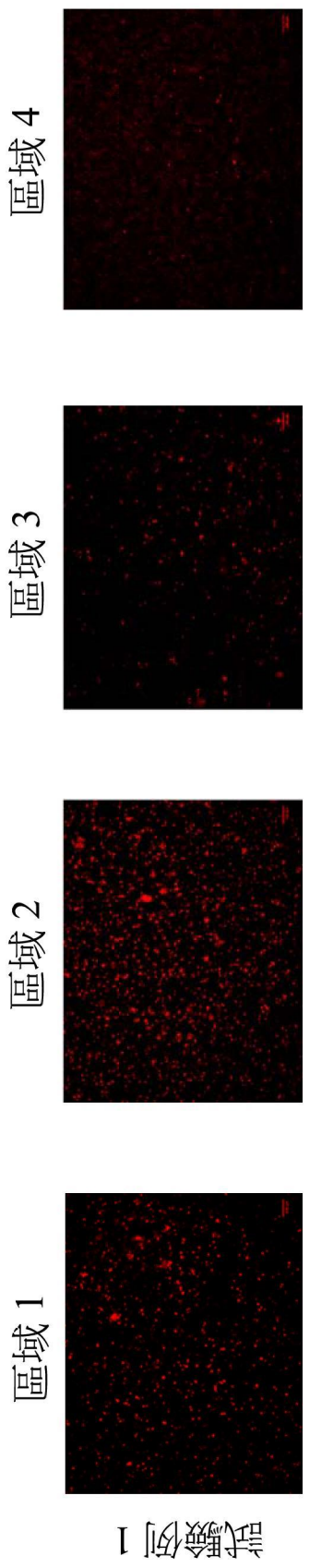
第 4 圖



第 6 圖

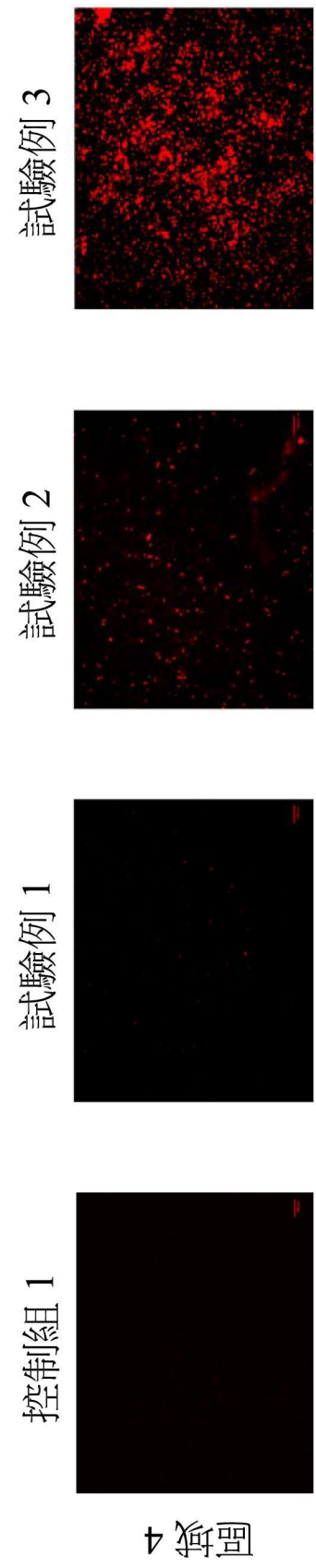


第 5 圖

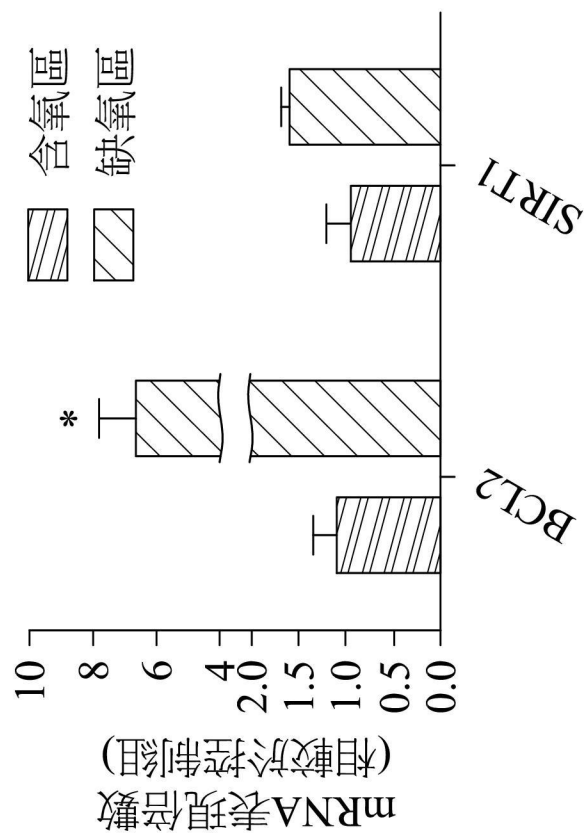


試驗例 1

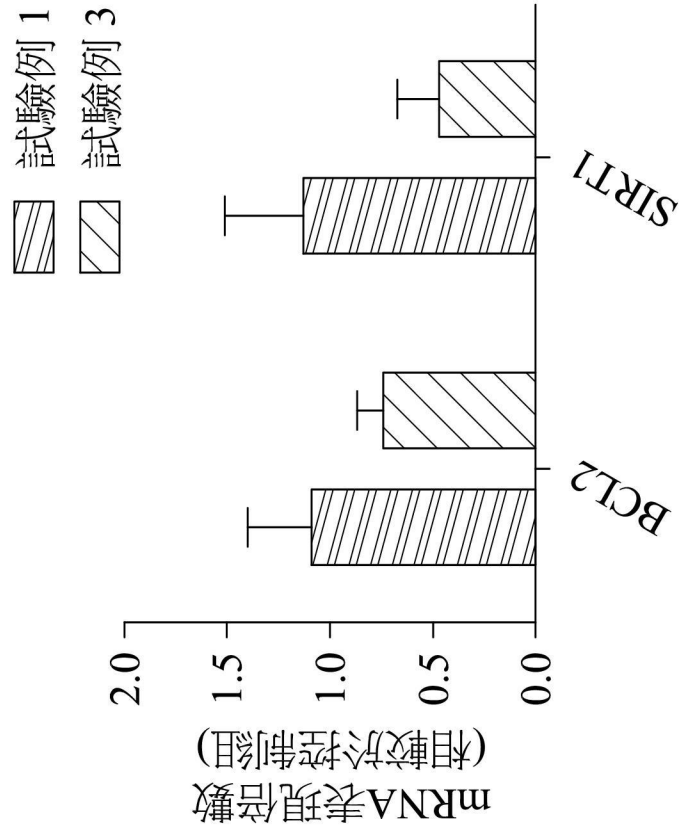
第 7A 圖



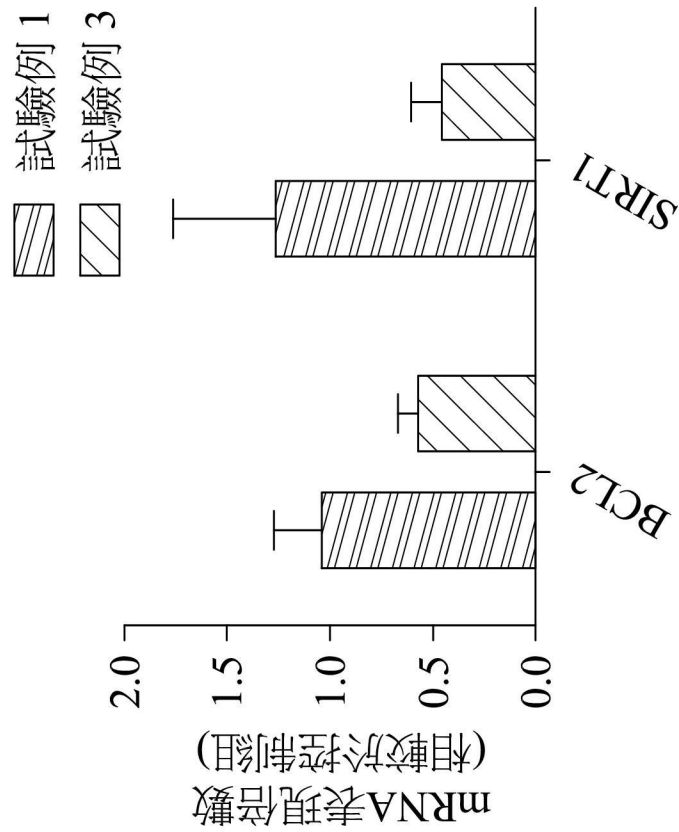
第 7B 圖



第8圖



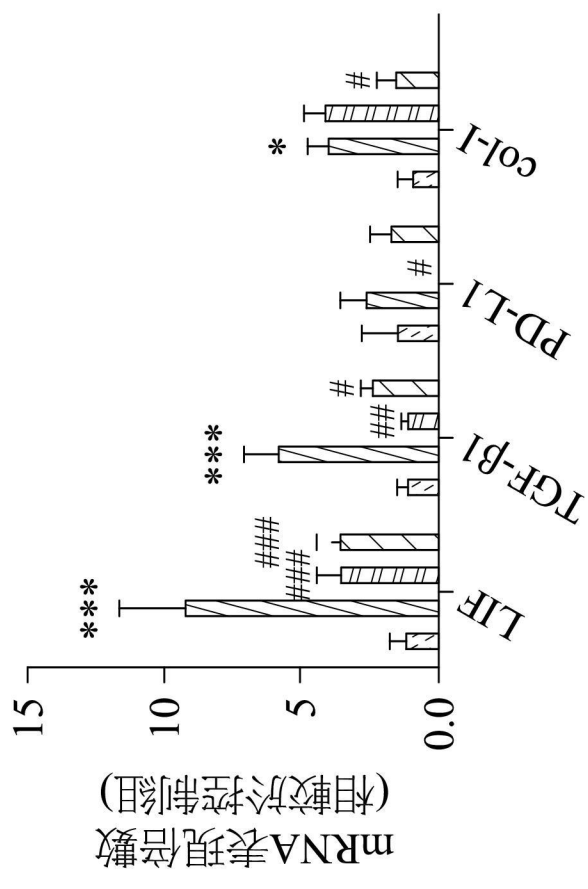
第9A圖



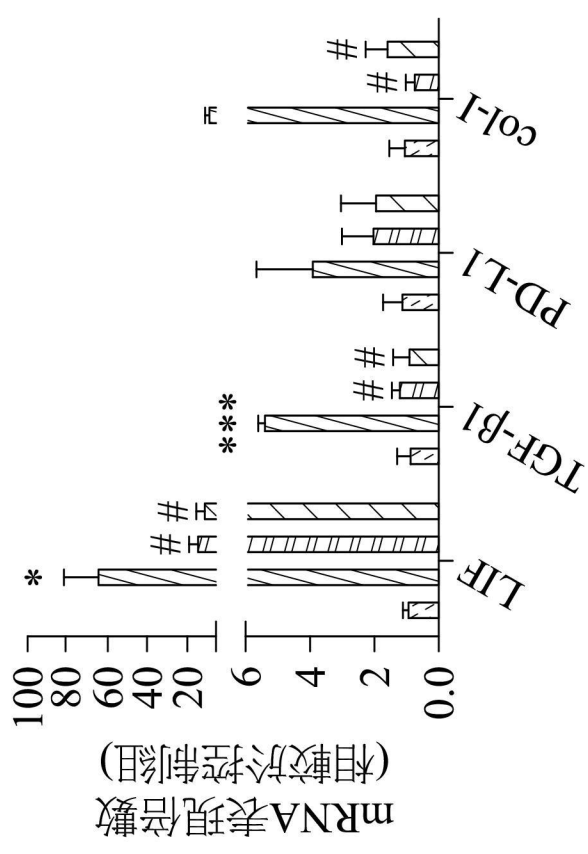
第9B圖

控制組 2 試驗例 5  
 試驗例 4 試驗例 6

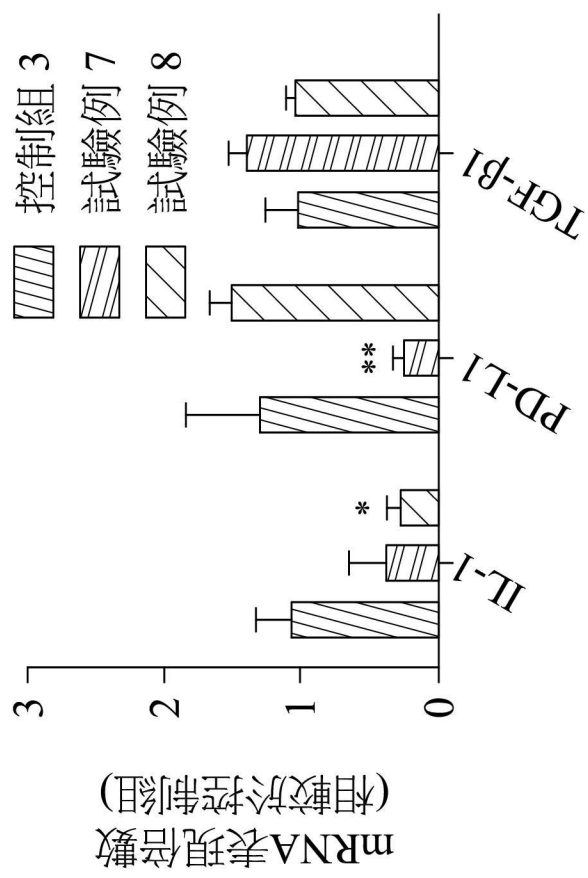
控制組 2 試驗例 5  
 試驗例 4 試驗例 6



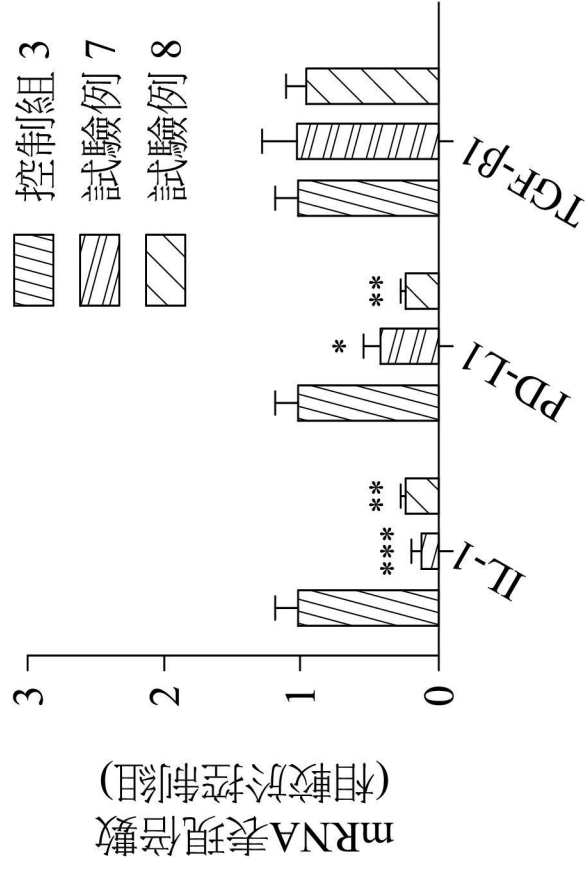
第 10B 圖



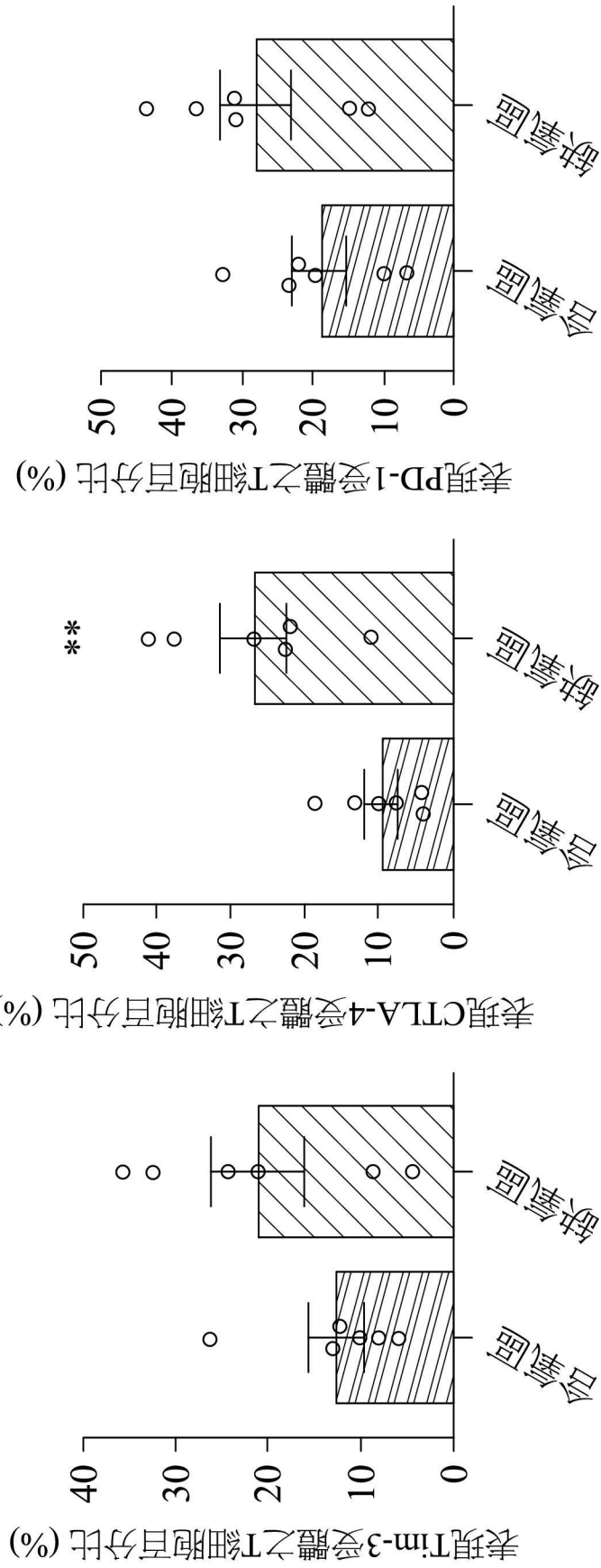
第 10A 圖



第 11A 圖



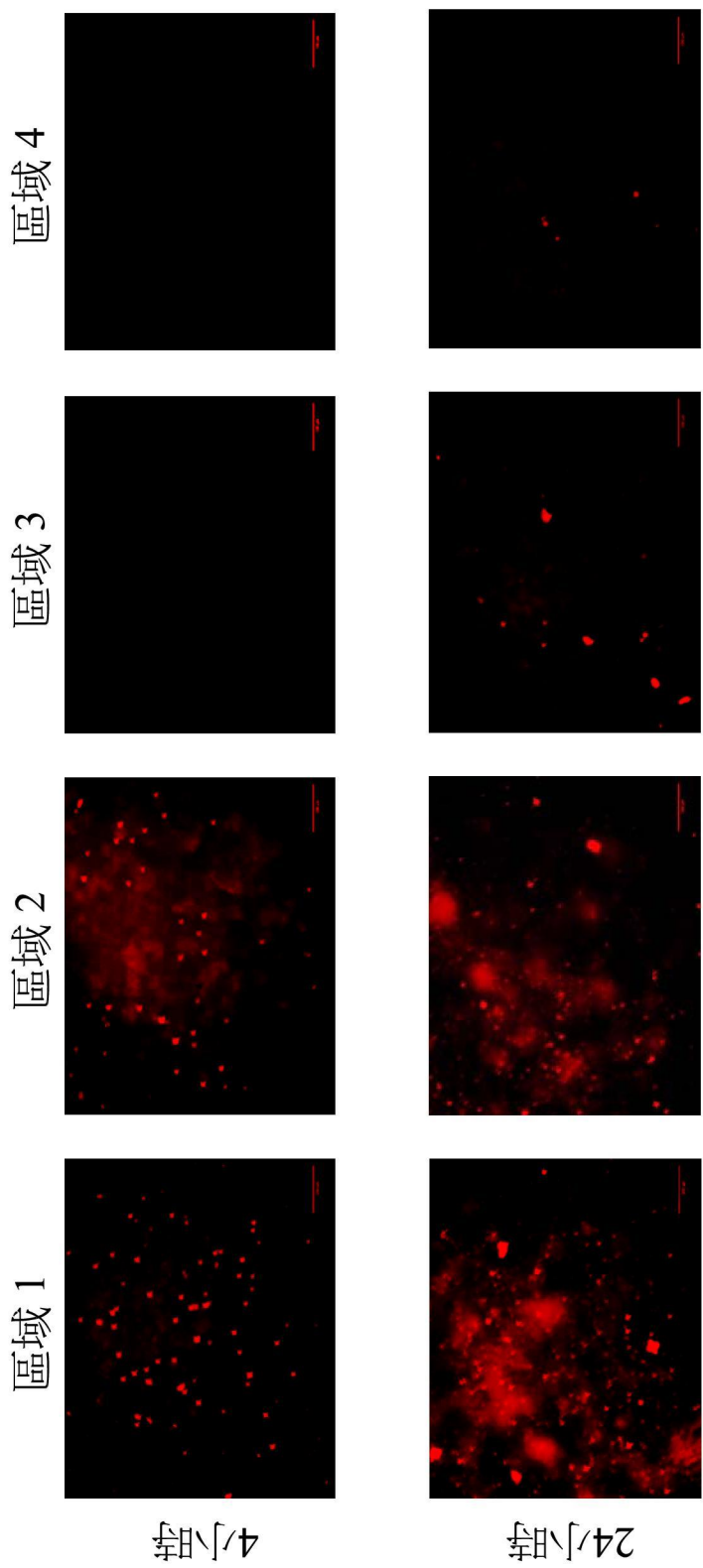
第 11B 圖



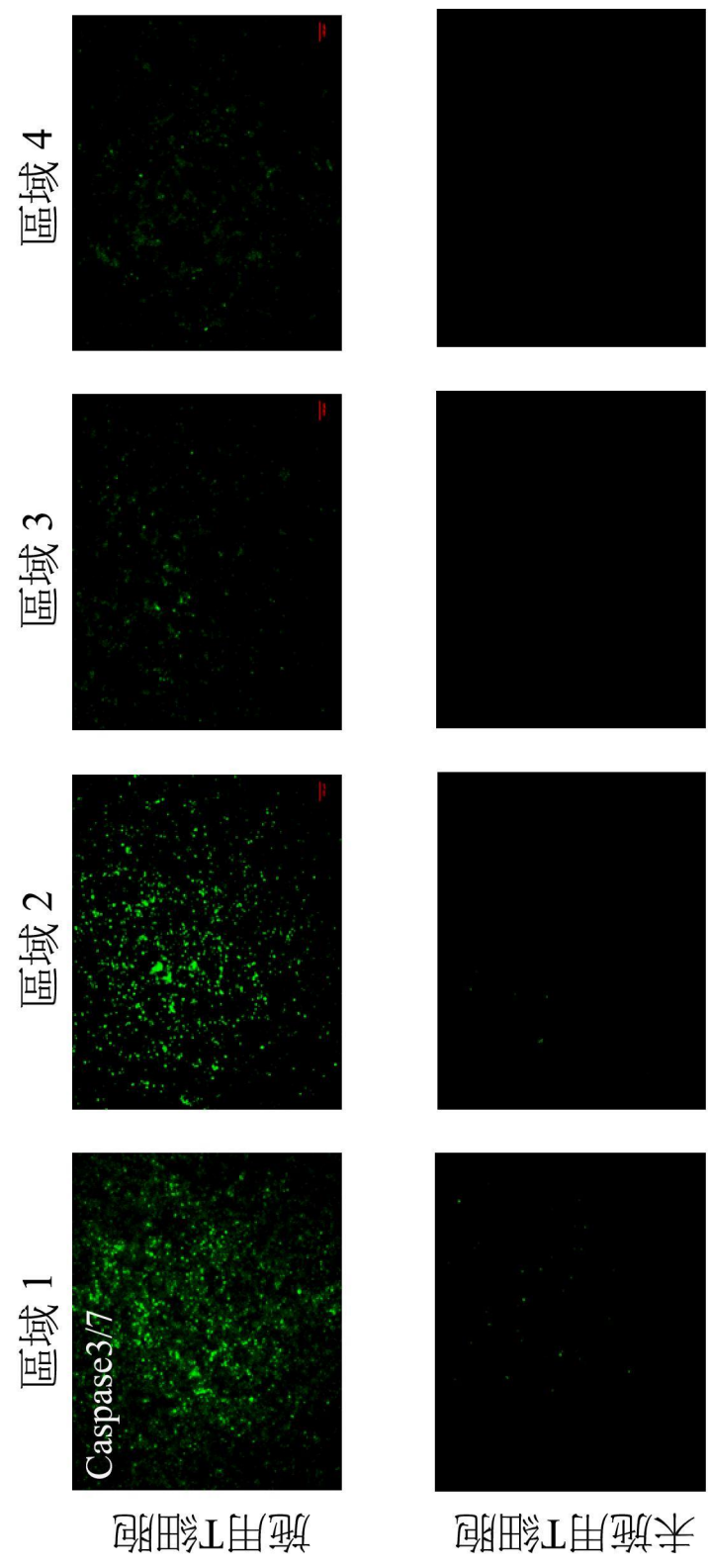
第12C圖

第12B圖

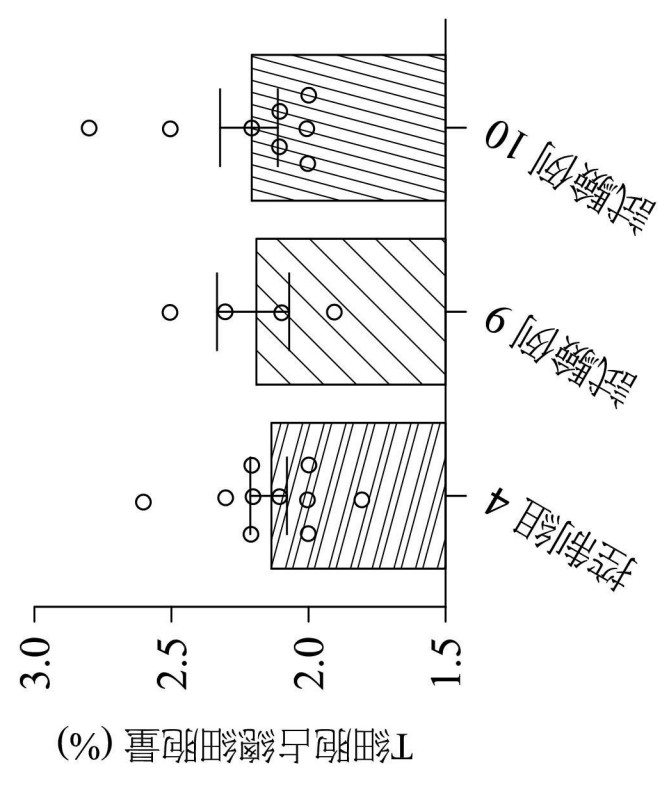
第12A圖



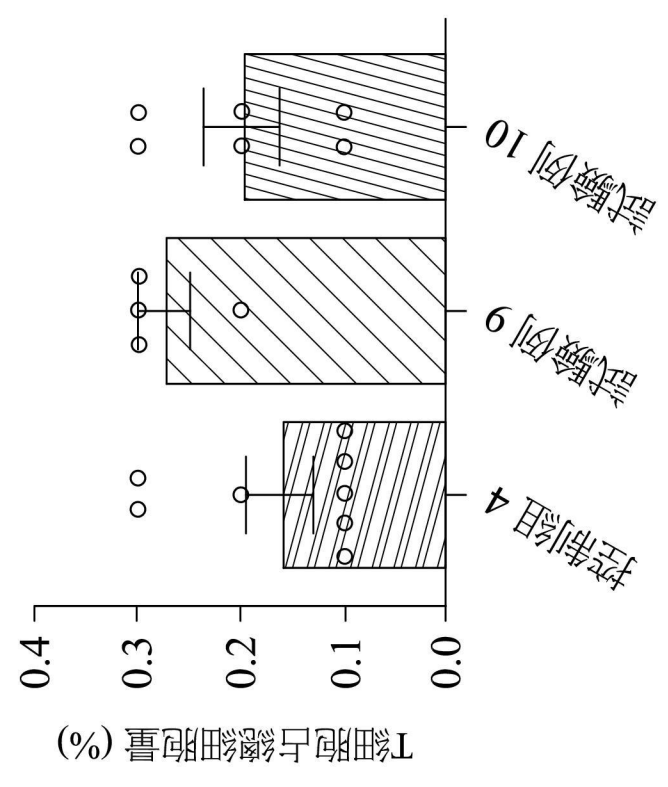
第 13 圖



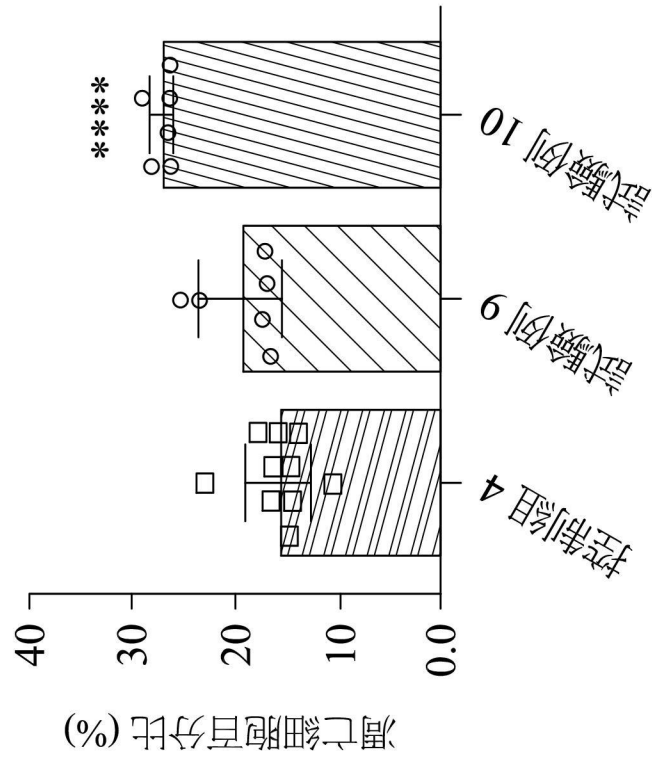
第 14 圖



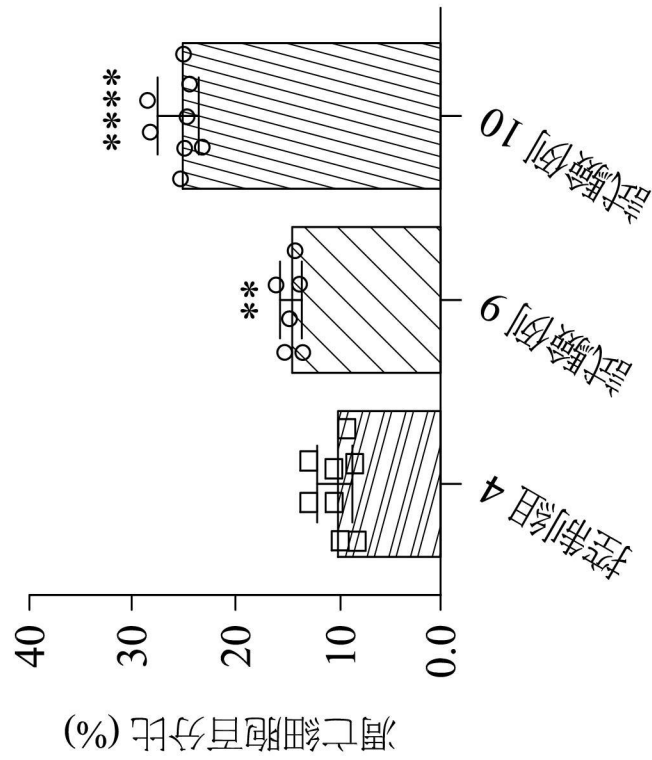
第 15B 圖



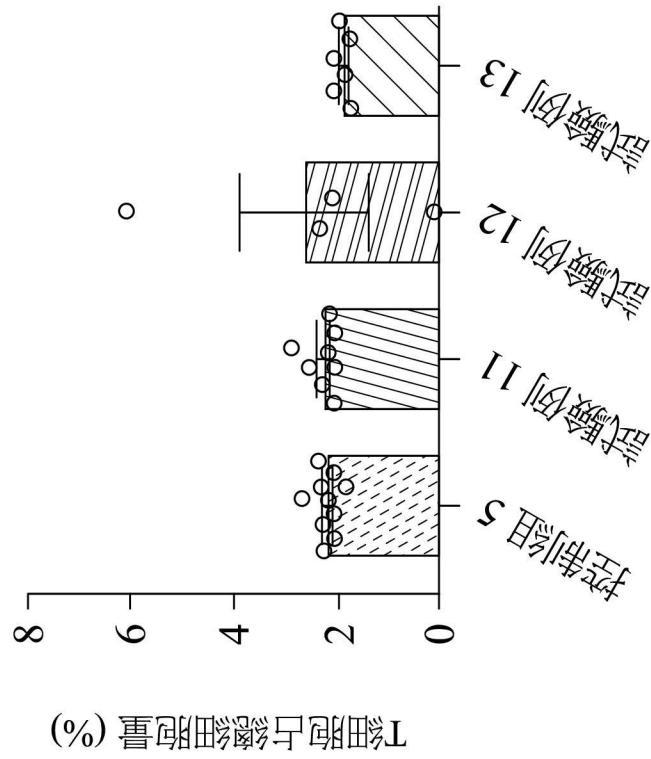
第 15A 圖



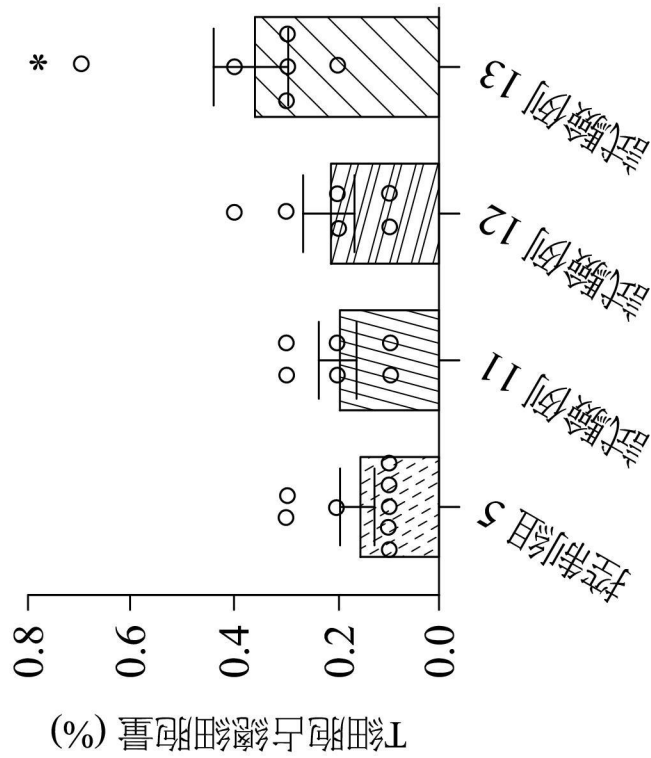
第 16B 圖



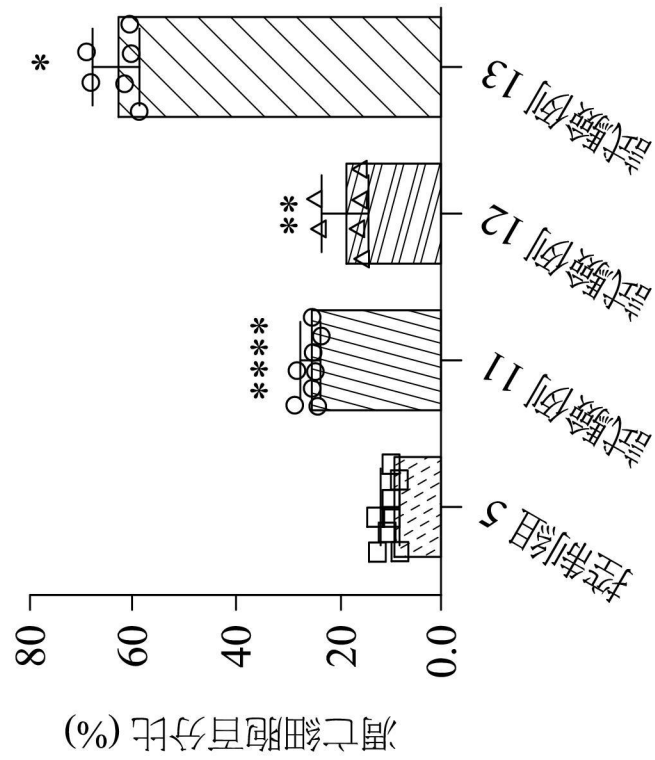
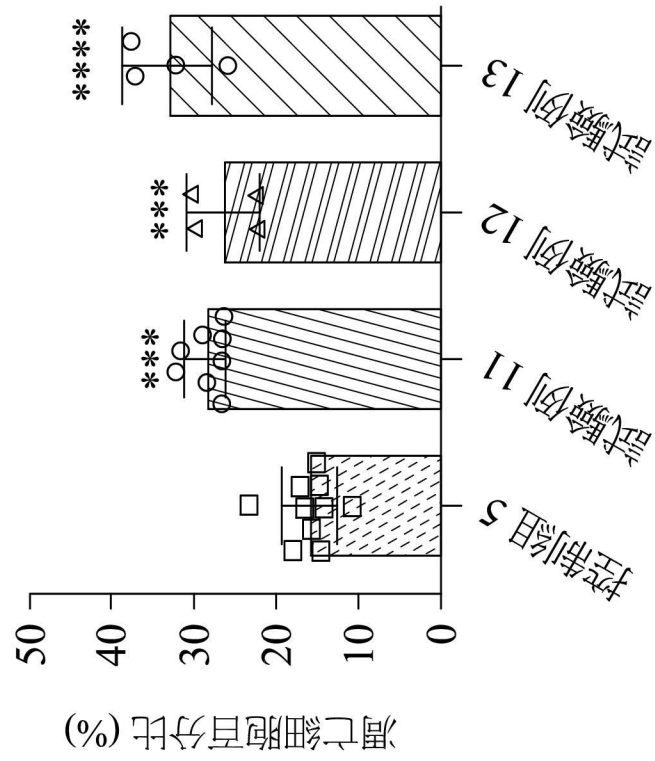
第 16A 圖



第 17B 圖



第 17A 圖



第 18B 圖

第 18A 圖