



微流控芯片在乳腺癌骨转移研究中的应用*

禹瞳垚¹⁾ 苑曦宸¹⁾ 王东恩¹⁾ 续惠云¹⁾ 杨鹏飞¹⁾ 商 澎^{1,2)**} 任 丽^{1)**}⁽¹⁾ 西北工业大学生命学院, 空间生物实验模拟技术重点实验室, 西安 710072; ⁽²⁾ 西北工业大学深圳研究院, 深圳 518057)

摘要 乳腺癌骨转移患者死亡率高达70%~80%, 目前缺乏有效的治疗药物. 微流控芯片技术能够有效模拟骨组织的生化和生物物理微环境, 便捷地实现模拟骨微环境中乳腺癌骨转移的研究, 这将为探索乳腺癌骨转移的细胞和分子机制、进而进行抗乳腺癌骨转移药物高通量筛选提供有价值的技术方法和平台. 本综述简要介绍了乳腺癌骨转移的分子机制和治疗药物研究现状, 详细阐述了乳腺癌骨转移的微流控芯片模型, 分析了基于微流控芯片技术进行抗乳腺癌骨转移药物高通量筛选的优势和挑战, 旨在为乳腺癌骨转移机制研究和药物筛选提供参考.

关键词 微流控芯片, 乳腺癌骨转移, 骨微环境, 药物筛选

中图分类号 Q6, Q81

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0168

2019年1月国家癌症中心发布的《2019年中国最新癌症报告》指出, 乳腺癌居中国女性恶性肿瘤发病率的首位, 从30岁左右开始发病率上升, 每年发病约为30.4万, 死亡率居第5位, 占有女性恶性肿瘤死亡总数的8.16%. 医学顶级期刊《临床医师癌症杂志》(*CA Cancer J Clin*)发表的《2015中国癌症统计数据》(*Cancer statistics in China, 2015*)显示: 乳腺癌是导致我国45岁以下女性死亡的主要原因^[1]. 20%~40%的乳腺癌幸存者最终会发生癌细胞转移, 患者年龄越小, 转移风险越大, 一旦发生转移, 5年内生存率仅为31%, 10年内的生存率低于20%^[2-3]. 骨、肺、肝、脑是常发的远距离转移器官, 尤其值得关注的是, 约48%的转移性乳腺癌发生于骨转移, 常伴有严重的骨痛、骨折、高钙血症、脊髓和神经压迫综合征等病变^[4], 基本不可治愈, 死亡率高达70%~80%^[2-3].

转移乳腺癌细胞在骨中定植、生长和形成转移病灶, 不仅与乳腺癌细胞的固有遗传和表观遗传特性密切相关, 而且与乳腺癌细胞和骨微环境之间的相互作用密不可分^[5]. 乳腺癌骨转移是癌细胞与骨微环境相互作用的结果, 其中成骨谱系细胞(osteoblast-lineage cells, OLCs)构成了转移早期癌细胞在骨中的直接细胞微环境, 促进乳腺癌细胞定植、存活和增殖形成微转移^[6], 随着转移的进

一步发展, 破骨细胞与乳腺癌细胞形成彼此互相支持的“恶性循环”, 形成溶骨性骨损伤^[7].

目前临床上乳腺癌骨转移的标准治疗方法, 主要是利用双膦酸盐类药物抑制破骨细胞的形成和功能, 从而抑制破骨细胞与乳腺癌细胞之间的“恶性循环”, 延缓乳腺癌骨转移的发展. 然而疗效不佳, 在接受治疗的患者中, 仍有30%~50%的患者出现新的骨转移、骨骼综合征和疾病发展^[8]. 如能将乳腺癌骨转移控制在早期阶段, 即抑制OLCs与乳腺癌细胞之间的相互作用, 进而抑制癌细胞在骨中的定植和存活, 有望为乳腺癌骨转移早期治疗提供新策略.

目前乳腺癌骨转移机制研究与抗肿瘤药物筛选主要采用二维(two dimensional, 2D)细胞培养和动物实验模型, 虽已获得大量重要的研究成果, 但其不足之处显而易见. 2D细胞培养主要采用细胞培养板、培养皿(瓶)等实现乳腺癌细胞的体外培养, 几乎没有考虑骨组织中缺氧、间质流体等生物

* 陕西省自然科学基金基础研究计划(2018JM3005)和中央高校基本科研业务费(3102016ZY041)资助项目.

** 通讯联系人.

任丽. Tel: 029-88491613, E-mail: renli@nwpu.edu.cn

商澎. Tel: 029-88460391, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn

收稿日期: 2020-06-01, 接受日期: 2020-10-15

物理微环境对乳腺癌细胞-骨组织细胞之间相互作用和药物作用效果的影响^[9-11]. 动物实验模型主要利用人源乳腺癌细胞系经心脏、骨髓或肌肉注射进入免疫缺陷小鼠体内, 构建乳腺癌骨转移模型^[12-13]. 虽然动物实验模型能较好地模拟体内生理微环境, 却不能准确分析癌细胞与骨微环境之间高度特异性的相互作用, 且用于药物筛选成本颇高, 获得的药物筛选结果往往在人体内不能重现^[9].

微流控芯片起源于微机电加工技术, 现已发展成为一个独特的前沿技术. 2006年《自然》杂志(*Nature*)发表文章《微流控芯片的起源与未来》(*The origins and the future of microfluidics*), 将微流控芯片定义为使用数十到数百微米尺寸的通道对极微量体积($10^{-9} \sim 10^{-18}$ L)流体进行操纵的科学与技术^[14]. 此外, 微流控芯片可实现体外细胞培养方式和培养微环境的精确控制^[15]. 微流控芯片技术的针对问题定制化设计特点, 使其在组织微环境模拟方面体现出了其他技术不可比拟的优势. 基于微流控技术的器官芯片(*organ-on-a-chip*)克服了传统方法在技术上的限制, 所构建的乳腺癌骨转移模型, 不仅能够实现细胞三维(three dimensional, 3D)培养, 在体外重现细胞与细胞、细胞与基质之间的相互作用, 而且能够有效模拟骨组织中缺氧、间质流体等重要的生物物理微环境, 在仿生微环境中研究细胞间相互作用和药物作用效果, 且可通过高分辨率成像系统进行实时成像和结果分析^[9]. 在乳腺癌骨转移机制研究和抗肿瘤药物筛选中的优势不言而喻.

本文简要介绍了乳腺癌骨转移的过程、目前已获知的分子机制和抗肿瘤药物研究现状, 详细阐述了乳腺癌骨转移微流控芯片模型的结构特点及其在机制研究和药物筛选中的应用, 讨论了基于微流控技术实现抗肿瘤药物高通量筛选的可行性.

1 骨微环境与乳腺癌骨转移

乳腺癌骨转移是一个复杂的病理过程, 癌细胞从原发部位进入脉管系统, 在骨中定植、存活并增殖形成转移病灶, 取决于癌细胞的内在特性及其与骨微环境中OLCs和破骨细胞等细胞之间的相互作用. OLCs构成了乳腺癌细胞骨转移早期阶段的直接细胞微环境, 支持乳腺癌细胞在骨中的定植和存活, 主要包括3种类型: 具有骨形成功能的成骨细胞及其前体细胞、处于静止骨表面的骨衬细胞, 和偶联骨吸收与骨形成过程的逆转期细胞. 破骨细胞

是骨中主要执行骨吸收功能的细胞, 在转移进一步发展过程中, 支持乳腺癌细胞增殖, 乳腺癌细胞也分泌细胞因子促进破骨细胞的骨吸收功能, 从而形成“恶性循环”, 发生溶骨性骨损伤.

1.1 乳腺癌骨转移过程

乳腺癌骨转移过程经历了4个阶段(图1a). a. 定植: 乳腺癌细胞定植于骨表面的OLCs微环境中(约1~2年); b. 存活或休眠: 乳腺癌细胞适应此微环境, 存活并进入一个长期休眠状态(约1~10年); c. 激活: 骨微环境发生改变时, 乳腺癌细胞被激活, 增殖形成微转移; d. 生长: 乳腺癌细胞生长失控, 与破骨细胞形成彼此相互支持的“恶性循环”, 形成转移病灶, 发生溶骨性骨损伤(后两个阶段历时约1~2年)^[7].

1.2 乳腺癌骨转移的细胞与分子机制

1.2.1 乳腺癌细胞定植

研究发现, 超过50%的早期乳腺癌患者骨髓中含有播散性乳腺癌细胞^[16]. Devignes等^[6]利用小鼠乳腺癌骨转移模型, 最早在后肢生长板下方的松质骨表面检测到乳腺癌细胞, 其中高度缺氧且富含成骨前体细胞, 成骨前体细胞表达缺氧诱导因子1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α), HIF信号进一步促进OLCs表达趋化因子C-X-C基元配体12 (chemokine C-X-C motif ligand 12, CXCL12), 直接活化C-X-C趋化因子受体4 (C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR4), 促进乳腺癌细胞定植和增殖.

1.2.2 乳腺癌细胞休眠

乳腺癌细胞在骨中定植后, 通常将进入休眠状态, OLCs和缺氧微环境在其中起着积极的作用^[7, 17]. OLCs来源的信号分子通过调控乳腺癌细胞的细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)与p38丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)的活化比例, 来调控乳腺癌细胞在休眠和活化中的转化, ERK/p38活化比例低的乳腺癌细胞处于生长阻滞的休眠状态^[18-19]. 缺氧微环境可能在维持乳腺癌细胞休眠状态中发挥作用.

1.2.3 乳腺癌细胞激活

实验室研究和临床数据均证实, 乳腺癌细胞在OLCs微环境中被激活, 具有骨形成功能的成骨细胞通过N-钙黏蛋白与乳腺癌细胞的E-钙黏蛋白形成异型黏着连接, 激活乳腺癌细胞的雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号

通路, 促进单个乳腺癌细胞增殖形成微转移 (图 1b)^[20]. 此外, 乳腺癌细胞不能直接从骨微环境中摄取 Ca^{2+} , 而是依赖于与成骨细胞通过连接蛋白 43 (connexin 43, Cx43) 形成的间隙连接, 从成骨细

胞中吸收 Ca^{2+} (图 1c), 这种顺浓度梯度的 Ca^{2+} 流动成为乳腺癌细胞 Ca^{2+} 的主要来源, 支持乳腺癌细胞生长^[21].

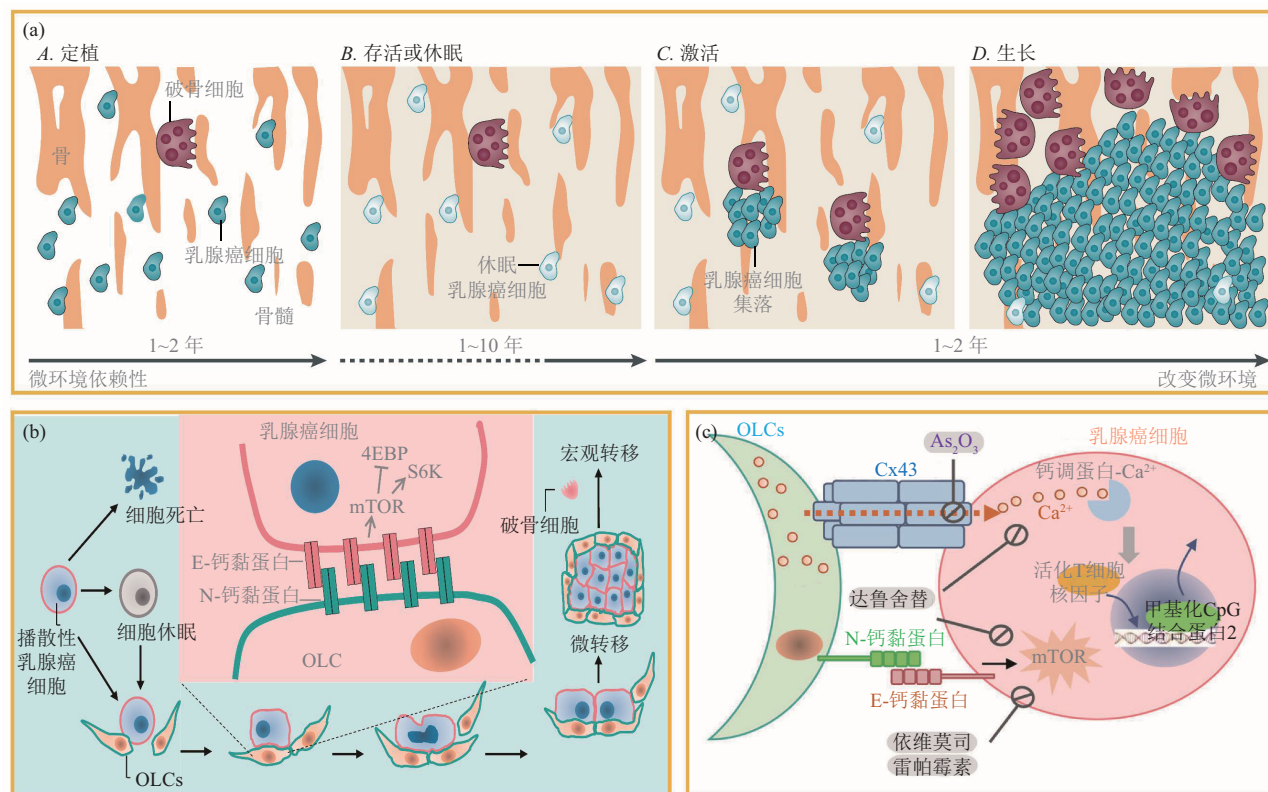


Fig. 1 Schematic diagram of the process and mechanism for bone metastasis in breast cancer

图1 乳腺癌骨转移过程及机制图

(a) 乳腺癌骨转移的4个阶段: 乳腺癌细胞在骨中定植 (A)、存活或休眠 (B)、激活 (C) 和生长 (D)^[7]; (b) OLCs构成乳腺癌细胞骨转移早期阶段的直接细胞微环境, 通过N-钙黏蛋白与乳腺癌细胞的E-钙黏蛋白形成异型黏着连接, 激活乳腺癌细胞的mTOR信号通路, 促进单个乳腺癌细胞增殖形成微转移^[20]; (c) 成骨细胞通过Cx43与乳腺癌细胞形成间隙连接, 为乳腺癌细胞提供 Ca^{2+} , 支持乳腺癌细胞生长^[21].

1.2.4 乳腺癌细胞生长

激活的乳腺癌细胞持续分泌促破骨细胞生成因子来增强破骨细胞形成, 包括甲状旁腺激素相关肽 (parathyroid hormone related peptide, PTHrP)、核因子 κB 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, RANKL)、白介素 (interleukin, IL)、前列腺素 E (prostaglandin E, PGE)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 和巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, MCSF)^[22]. 反之, 破骨细胞在骨吸收过程中释放骨基质中的因子促进乳腺癌细胞生长, 包括转化生长因子 β (transforming

growth factor- β , TGF- β)、胰岛素样生长因子 (insulin like growth factor, IGF)、血小板源性生长因子 (platelet-derived growth factors, PDGFs) 和骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs)^[22-23]. 这种乳腺癌细胞-破骨细胞相互作用是“恶性循环”学说的主要基础.

1.3 乳腺癌骨转移的治疗药物

1.3.1 抑制破骨细胞-乳腺癌细胞相互作用的药物

目前临床上治疗乳腺癌骨转移的主要策略, 是通过抑制破骨细胞的骨吸收功能, 达到抑制破骨细胞与乳腺癌细胞之间“恶性循环”、延缓乳腺癌骨转移发展的目的. 抗骨吸收药物二磷酸盐、

RANKL 抗体狄诺塞麦等是常用的药物, 与放疗、化疗相结合用于治疗乳腺癌骨转移. 但是这些治疗方法并不能治愈乳腺癌骨转移, 且存在明显的副作用, 如导致骨量下降、低钙血症、下颌骨坏死等^[16, 22].

目前, 研究人员针对破骨细胞-乳腺癌细胞相互作用, 提出了一些新型的药物^[24], 组织蛋白酶K (cathepsin K) 抑制剂奥当卡替 (odanacatib), 抑制破骨细胞骨吸收的功能; 酪氨酸激酶 c-Src 抑制剂塞卡替尼 (saracatinib) 和博舒替尼 (bosutinib), 通过抑制 RANKL/RANK 相互作用, 抑制破骨细胞形成. 上述药物已在动物实验中被证实具有抑制骨吸收和乳腺癌细胞生长的作用, 但是目前尚无临床试验 (图2).

1.3.2 抑制OLCs-乳腺癌细胞相互作用的药物

目前临床上尚无针对 OLCs-乳腺癌细胞相互作用的药物. 国内外研究者针对乳腺癌骨转移的临床骨质流失特征, 提出通过增强成骨细胞的骨形成功能或缓解骨形成功能的抑制, 来缓解乳腺癌骨转移

的溶骨性骨损伤症状的思路, 并提出以下潜在的治疗靶点 (图2).

a. Wnt 信号通路: Wnt 信号通路在成骨细胞骨形成中发挥关键作用, 乳腺癌细胞分泌 Dickkopf-1 蛋白 (DKK-1) 阻断 Wnt 信号通路中低密度脂蛋白受体相关蛋白 (low-density lipoprotein receptor-related protein, LRP5/6) 与 Wnt-1 的相互作用, 抑制成骨细胞分化, DKK-1 抗体 BHQ880 可增加成骨细胞数量, 促进骨形成^[24]. 硬骨素 (sclerostin, SOST) 是骨细胞产生的 Wnt 信号抑制剂, 其作用与 DKK-1 相似. 因此, 研究者提出 DKK-1 抗体和硬骨素抗体可作为潜在的治疗药物, 但目前缺乏治疗乳腺癌的系统性研究和临床试验.

b. 组织蛋白酶K: 组织蛋白酶K是一种溶酶体半胱氨酸蛋白酶, 在破骨细胞中高表达, 在骨吸收过程中降解骨基质^[16, 24]. 组织蛋白酶K抑制剂奥当卡替不仅能够抑制骨吸收, 还能促进骨形成, 其作用在雌激素缺乏性骨质流失动物模型以及骨质疏松症妇女中已得到证实^[16].

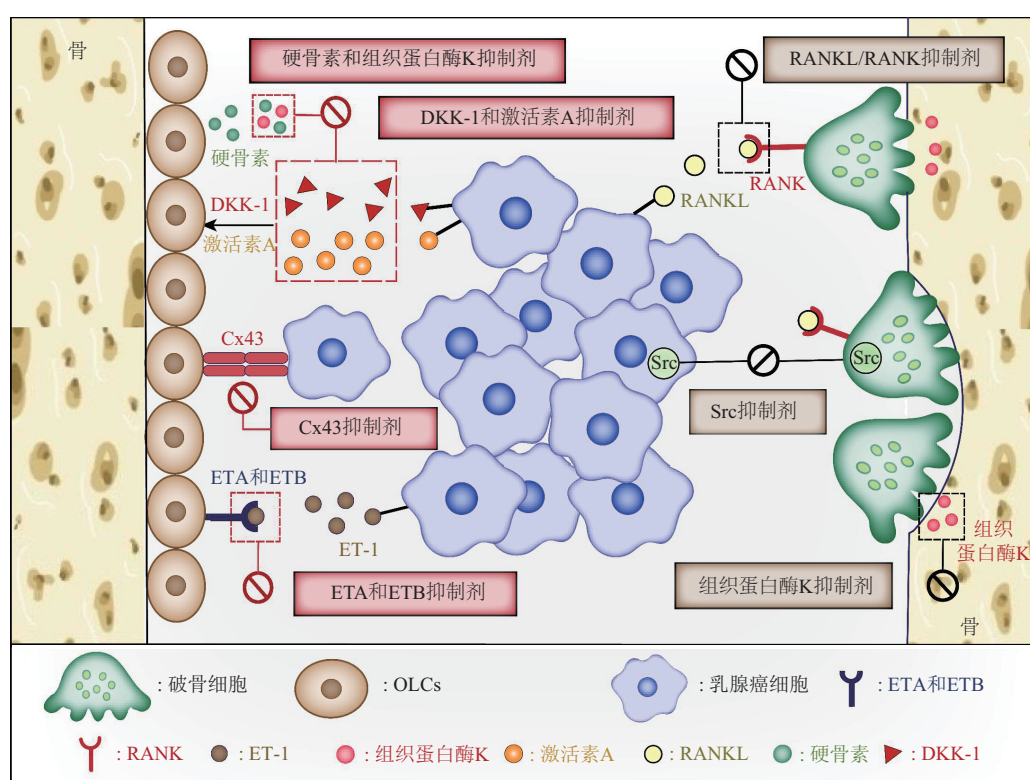


Fig. 2 Schematic diagram of potential therapeutic targets for bone metastases in breast cancer^[16, 24-25]

图2 乳腺癌骨转移潜在治疗靶点示意图^[16, 24-25]

抑制OLCs-乳腺癌细胞相互作用的潜在药物: 硬骨素和组织蛋白酶K抑制剂, DKK-1和激活素A抑制剂, Cx43抑制剂, ETA和ETB抑制剂; 抑制破骨细胞-乳腺癌细胞相互作用的潜在药物: RANKL/RANK抑制剂, Src抑制剂, 组织蛋白酶K抑制剂.

c. 激活素 A (activin A): 激活素 A 是 TGF- β 超家族的成员, 乳腺癌细胞表达激活素 A, 抑制成骨细胞分化^[24], 同时促进破骨细胞分化. 目前没有针对激活素 A 抑制剂抗乳腺癌骨转移的临床实验研究.

当前也有研究者提出针对成骨细胞-乳腺癌细胞相互作用的潜在治疗靶点 (图2).

a. 内皮素 1 (endothelin-1, ET-1): 乳腺癌细胞表达的 ET-1 与成骨细胞表达的细胞表面受体内皮素受体 A (endothelin A, ETA) 和内皮素受体 (endothelin B, ETB) 相互作用引起骨转移. ETA 抑制剂阿曲生坦 (atrasentan, ABT-627) 及 ETA 和 ETB 复合抑制剂波生坦 (bosentan) 在动物实验中均能抑制乳腺癌骨转移, 目前缺乏相关临床试验^[24].

b. Cx43: 乳腺癌骨转移早期, 成骨细胞与乳腺癌细胞通过 Cx43 形成间隙连接, 为乳腺癌提供 Ca^{2+} , 支持乳腺癌细胞生长. 乳腺癌骨转移的离体骨组织药物实验发现, As_2O_3 和达鲁舍替 (danusertib) 可降低 Cx43 的表达水平, 减少 Ca^{2+} 从成骨细胞向乳腺癌细胞的流动, 从而抑制乳腺癌细胞生长^[25]. 其中, As_2O_3 是 FDA 批准的治疗急性早幼粒细胞白血病的药物.

综上所述, 乳腺癌骨转移经历了复杂的 OLCs-乳腺癌细胞、破骨细胞-乳腺癌细胞相互作用, 最终发展为溶骨性骨损伤, 目前缺乏有效的治疗药物. 2D 细胞培养和动物实验模型自身的局限性, 限制了抗肿瘤药物的开发.

2 乳腺癌骨转移微流控芯片模型

微流控芯片独特的细胞微环境模拟特性, 可实现骨组织中可控生化微环境和生物物理微环境相结合的有效模拟, 研究癌细胞跨血管内皮屏障向骨组织中的植入、存活、增殖等复杂过程. 以上特征无法用传统研究方法 (如 Boyden 小室^[26]、平行平板流体腔^[27]、Billups-rothenberg 细胞缺氧小室^[28]、划痕实验等^[26]) 实现.

骨组织是一个复杂、坚硬且具有弹性的组织, 分布着大量毛细血管网络, 活细胞被嵌入矿化的有机基质中, 该基质主要由羟基磷灰石和 I 型胶原组成, 构成了骨组织细胞的主要 3D 生化微环境^[29-30]. 缺氧和间质流体构成了骨组织的主要生物物理微环境. 骨组织中普遍缺氧, 实验和数学模拟方法得到骨中氧张力水平约为 1%~6%^[31], 间质

流体的流速范围为 0.1~5 $\mu\text{m/s}$, 间质流体为骨组织细胞提供营养, 并为细胞提供力学刺激, 调节组织形态发生^[32]. 本文将详细阐述当前乳腺癌骨转移微流控芯片模型在骨组织生化/生物物理微环境模拟和癌细胞-骨微环境相互作用研究中的应用.

Kamm 课题组^[33] 构建的乳腺癌骨转移微流控芯片模型, 研究了乳腺癌细胞向骨微环境中的侵入和形成微转移 (图 3a). 具体而言, 该芯片由聚二甲基硅氧烷 (poly-dimethyl-siloxane, PDMS) 制作, 由 3 个培养基管道和 4 个独立的凝胶管道组成, 管道高度为 150 μm , 凝胶管道有 8 个 225 μm $\times$ 120 μm 的区域与培养基管道相通^[33-34], I 型胶原蛋白溶液与成骨分化的人骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 混合后注入 4 个独立的凝胶管道中, 形成成骨 3D 微环境, 中央培养基管道中培养血管内皮细胞, 待中央培养基管道的管壁和凝胶-培养基管道接触界面形成血管内皮细胞单层后, 在培养基管道注入乳腺癌细胞, 基于此 3 种细胞共培养系统, 重建了血管化的骨微环境, 观察了乳腺癌细胞跨血管内皮向成骨微环境中侵入, 以及在骨微环境中的增殖和形成微转移的过程, 证明乳腺癌细胞受体 C-X-C 趋化因子受体 2 (C-X-C chemokine receptor type 2, CXCR2) 和骨分泌的趋化因子趋化因子 C-X-C 基元配体 5 (chemokine C-X-C motif ligand 5, CXCL5) 在癌细胞侵入过程中起主要作用, 影响侵入率和迁移距离. Kamm 课题组^[35] 另一项研究, 采用类似的微流控芯片模型构建了血管化骨微环境 (图 3b), 证实 A3 腺苷受体 (A3 adenosine receptors) 能抑制乳腺癌细胞向骨微环境的迁移渗入. 上述研究提供了体外骨微环境中乳腺癌细胞侵入和形成微转移的定量研究数据, 在乳腺癌骨转移生物学研究和开发新疗法中具有潜在的应用价值. Marturano-Kruik 等^[36] 构建了模拟骨组织血管周围微环境的微流控芯片模型 (bone perivascular niche-on-a-chip) (图 3c). 作者利用去除细胞的骨基质作为 3D 支架材料, 通过 3D 共培养 MSCs 与血管内皮细胞, 构建了血管化骨微环境. 之后, 通过向 3D 微环境中持续灌注培养基, 形成了流速约为 3.1 $\mu\text{m/s}$ 的模拟间质流体微环境, 并基于氧气在芯片内的扩散和对流传输, 以及细胞消耗氧气, 在 3D 微环境中形成了沿流体方向氧含量急剧下降 75% 的缺氧微环境. 在此微环境中灌注乳腺癌细胞悬液, 观察了癌细胞在骨微环境中的植入和增殖. 发现与静态培养相比, 乳腺癌细胞

胞在上述微环境中的植入率、增殖速率和对抗肿瘤药物的敏感性均显著降低,提示乳腺癌细胞可能在流体微环境中进入休眠状态.与其他大多数微流控系统相比,该乳腺癌骨转移微流控芯片模型通过精确控制流体微环境,可实现大尺寸骨组织培养,从而可以实时评估乳腺癌骨转移定植的早期事件,有助于确定介导乳腺癌细胞休眠的关键微环境因素,进而有助于开发更有效的治疗措施.

Sano 等^[37]构建了一种血管化的多细胞共培养

球,研究乳腺癌细胞穿过血管网络向细胞球的浸润(图3d).首先将成纤维细胞、内皮细胞和MSCs共培养于水凝胶中形成多细胞球,并将细胞球导入微流控芯片管道内,再将内皮细胞接种至多细胞球两侧,形成了可灌注式的血管化多细胞球,而后将乳腺癌细胞灌注至两侧微管道,观察乳腺癌细胞穿过血管网络向多细胞球中迁移的过程,发现相比未分化的MSCs,骨微环境中乳腺癌细胞表现出更高的迁移率.该研究为基于模拟体内微环境和血管网络

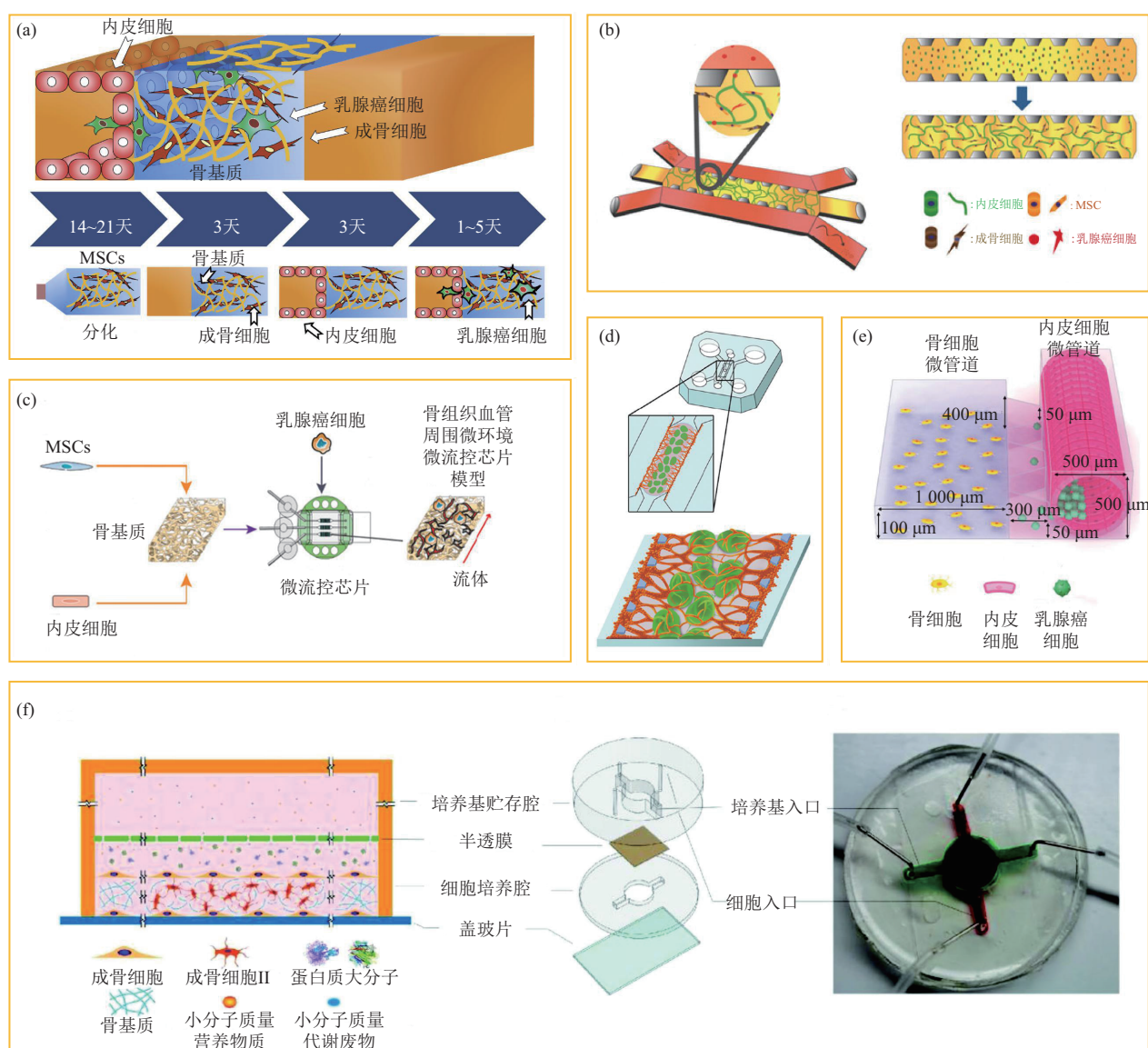


Fig. 3 Microfluidic chip model of breast cancer bone metastasis

图3 乳腺癌骨转移微流控芯片模型

(a) 乳腺癌骨转移微流控芯片模型研究乳腺癌细胞向骨微环境中的侵入和形成微转移^[33]; (b) 血管化骨微环境微流控芯片模型研究乳腺癌细胞向骨微环境的迁移渗入^[35]; (c) 骨组织血管周围微环境微流控芯片模型研究缺氧和间质流体对乳腺癌细胞在骨中定植的影响^[36]; (d) 血管化微流控芯片模型研究乳腺癌细胞跨血管网络向成纤维细胞、内皮细胞和MSCs共培养细胞球的迁移^[37]; (e) 骨组织间质流体微环境模拟微流控芯片模型研究力学刺激骨细胞对共培养乳腺癌迁移的影响^[38]; (f) 骨芯片模型研究共培养的乳腺癌细胞在模拟骨组织中休眠和形成微转移的过程^[39].

研究乳腺癌骨转移过程中, 癌细胞与微环境中的基质细胞相互作用提供了新途径。

Mei 等^[38]构建了一种模拟骨组织间质流体的细胞共培养微流控芯片模型, 研究骨细胞在力学调控乳腺癌细胞迁移中的作用(图 3e)。该模型实现了骨细胞、血管内皮细胞和乳腺癌细胞的共培养, 其中乳腺癌细胞接种于管壁由血管内皮细胞形成单层的微管道中, 该微管道与相邻的骨细胞微管道通过充满水凝胶的侧管道相连。通过对骨细胞施加强生理性振荡流体刺激(1 Pa, 1 Hz), 观察到与静态共培养相比, 流体刺激骨细胞显著增加了乳腺癌细胞向骨细胞微管道中的迁移距离和迁移比例。该模型将为体外研究力学刺激调节乳腺癌骨转移机制提供一个有效的技术方法。

Hao 等^[39]构建骨芯片(bone-on-a-chip, BC)形成 3D 矿化胶原骨组织, 观察了共培养的乳腺癌细胞在模拟骨组织中休眠和形成微转移的过程(图 3f)。该 BC 模型由顶部培养基贮存腔和底部细胞培养腔组成, 中间由一个半透膜隔开。成骨细胞 3D 培养于底部培养腔的胶原凝胶基质 720 h 后自发形成 3D 矿化的仿生骨组织。共培养实验中, 植入胶原骨组织表面的转移抑制乳腺癌细胞系 MDA-MB-231-BRMS1 进入休眠状态, 既不形成大的细胞克隆, 也不侵入骨组织中, 而共培养的乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 具有截然不同的表现, 形成长的侵袭性伪足, 消耗周围基质形成大的孔洞, 并增殖形成微转移, 上述现象仅在体内实验中被证实, 由此可见, 该 BC 模型作为乳腺癌骨转移的体外研究模型, 在研究乳腺癌骨转移的生物学机制中具有极好的潜在应用前景。

3 微流控高通量药物筛选

基因和蛋白质组测序技术的发展, 使人们能够更好地理解疾病机制, 进而进行药物开发和筛选^[40]。在大量备选抗肿瘤药物的筛选中, 传统 2D 细胞培养和动物实验还存在很多不足, 不仅耗时长、成本高, 动物实验还存在一定的伦理问题, 而且不能模拟生理微环境, 最终筛选出的候选药物不能进入临床使用^[41-42]。利用微流控技术进行高通量药物筛选有以下几个优点^[42-43]: a. 细胞和试剂用量少、成本低、灵敏度高, 微流控芯片的细胞培养腔尺寸以 μm 为单位, 体积一般为 nL 至 μL , 细胞用量一般是 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个; b. 通过体外不同类型细胞共培养和微环境的有效控制, 能够更好地模拟

特定组织、器官的生化和生物物理微环境; c. 不涉及动物实验, 不存在伦理问题; d. 可以根据需要定制个性化结构, 如浓度梯度发生器及多元化细胞培养腔, 易于实现高通量筛选, 可以筛选大量不同种类、不同浓度和不同组合的药物; e. 可以实现单细胞或多细胞的单独培养或共培养, 能评估不同生物水平(即亚细胞、细胞、组织和器官水平)的相关药物反应。因此, 微流控芯片为高通量药物筛选提供了很好的平台。

高通量药物筛选的一个重要因素是浓度梯度的产生, 细胞在不同药物浓度下表现出不同的行为, 微流控技术能够更容易地构建浓度梯度^[44]。Kwapiszewska 等^[11]开发的药物筛选微流控芯片, 将癌细胞在半球形细胞培养腔中形成肿瘤球, 培养腔与浓度梯度发生器独立连接, 使药物在浓度梯度发生器中产生不同的浓度, 研究了癌细胞对不同浓度抗肿瘤药物的反应(图 4a)。Mulholland 等^[45]设计的高通量药物筛选平台由双层结构组成, 底层用于前列腺癌细胞成球培养, 顶层用于培养基、药物的灌注, 通过将药物和培养基分别加入两侧的进液口, 产生静水压实现浓度梯度, 进而实现药物浓度筛选的目的(图 4b)。Li 等^[46]用类似的浓度梯度产生方法模拟了肿瘤组织的缺氧梯度微环境, 研究不同氧气浓度下抗肿瘤药物的细胞毒性。Au 等^[47]设计了一种新型的数字化微流控平台, 将成纤维细胞与肝细胞共培养于水凝胶基质中构建肝组织, 利用有机液滴交换程序, 使药物与细胞培养基相混合至已知浓度, 从而实现浓度梯度(图 4c)。

高通量药物筛选的另一个重要因素是构建细胞培养/药物筛选单元的阵列式结构, 在不同的细胞培养/药物筛选单元内检测不同药物种类, 或不同浓度药物分子的作用。Xu 等^[48]设计了圆柱体形的细胞培养单元阵列, 通过在细胞培养单元底部灌注含有不同浓度神经元趋向分子的水凝胶, 使不同培养单元之间和同一培养单元的垂直方向上形成双重浓度梯度, 研究神经元对不同浓度梯度神经趋向分子的敏感性(图 4d)。荷兰 Mimetas 生物技术公司开发的微流控 OrganoPlate[®]系统, 包含 96 个微流控阵列式细胞培养单元(图 4e), 其原理是在 384 孔板底部进行微流控结构改造, 形成 3D 细胞培养和培养基灌注的双层微管道, 每个微流控单元与 384 孔板的孔相对应, 易于实现细胞密度、细胞 3D 培养基质和流体微环境的优化, 可极大地提高细胞培养和药物筛选效率, Lanz 等^[49]利用该系统 3D 灌

注式培养乳腺癌细胞,实现了一系列抗肿瘤药物的作用效果筛选.

此外,若将微流控浓度梯度发生器与细胞培养/药物筛选单元的阵列式结构相结合,易于在同一个芯片上实现药物种类和有效药物浓度的一步式筛选,并可在同一个芯片上设置多次重复实验组,

将极大地提高筛选效率和结果的可靠性.

然而,微流控芯片在乳腺癌骨转移高通量药物筛选方面仍缺乏相应的研究,结合微流控芯片模拟骨组织微环境以及在高通量药物筛选中的优势,为乳腺癌骨转移的高通量药物筛选提供了可能.

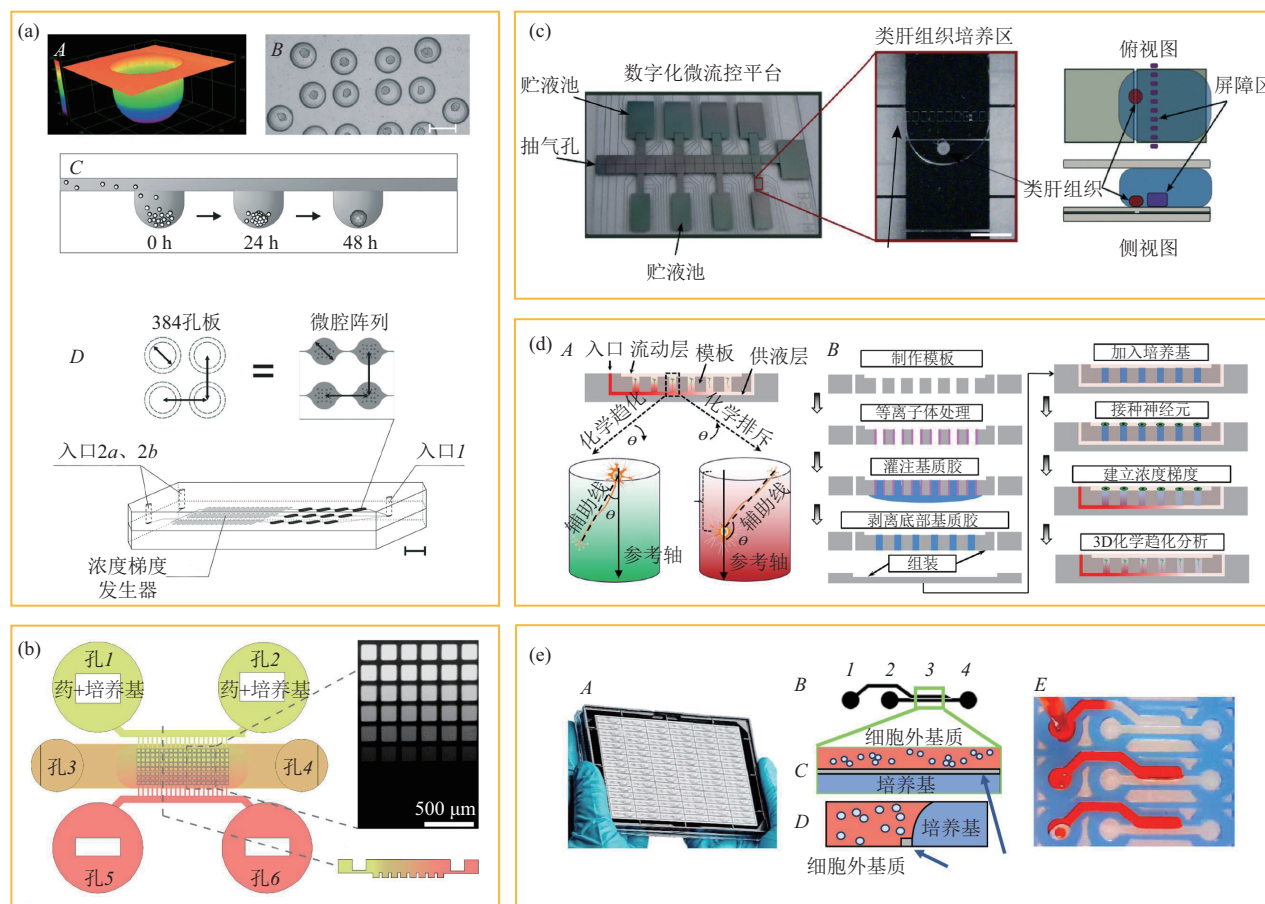


Fig. 4 Microfluidic high-throughput drug screening model

图4 微流控高通量药物筛选模型

(a) 半球形细胞培养腔微流控药物筛选模型用于不同浓度抗肿瘤药物筛选^[11]; (b) 双层微流控药物筛选模型用于不同浓度抗肿瘤药物筛选^[45]; (c) 利用有机液滴交换程序产生浓度梯度的新型数字化微流控平台^[47]; (d) 具有圆柱型细胞培养阵列及双重浓度梯度的微流控系统^[48]; (e) 微流控OrganoPlate®系统用于3D乳腺癌细胞培养和抗肿瘤药物筛选^[49].

4 微流控芯片用于抗乳腺癌骨转移药物高通量筛选的优势与挑战

《自然》杂志(*Nature*)于2017年发表的文章“Cancer biology still needs physicists”指出:“自2013年以来,每年关于癌症的论文发表量超过1.5万篇,然而这对癌症治疗并无有效帮助,癌症死亡率略有降低主要归功于减少吸烟等诸多预防措施

……当前转移癌的治疗费用仍然是个天文数字,而大多数的治疗基本无效……亟待寻找解释和治疗癌症转移的有效方法”^[50].

乳腺癌骨转移从起始到形成转移病灶,发生溶骨性骨损伤,经历了乳腺癌细胞在骨微环境中定植、休眠、激活和生长失控形成溶骨性骨损伤等阶段(图1a),其中定植阶段历时约1~2年,存活/休眠阶段历时约1~10年,激活和生长失控阶段历

时约1~2年. 定植和存活/休眠阶段历时较长, 转移的乳腺癌细胞存活但不增殖, 为乳腺癌骨转移治疗提供了极佳的窗口期. 然而动物实验模型大多利用人源乳腺癌细胞系经心脏注入小鼠体内, 大量癌细胞同时进入骨中, 有利于乳腺癌细胞的存活和短时间内形成溶骨性骨损伤, 但是难以建立早期乳腺癌骨转移(定植、存活/休眠)的动物模型, 不利于乳腺癌骨转移早期的药物筛选, 当前临床药物治疗也主要是针对生长失控的溶骨性骨损伤阶段.

如前所述, 乳腺癌骨转移早期, 骨微环境中OLCs构成了乳腺癌细胞直接接触的主要细胞微环境, 支持乳腺癌细胞定植和存活/休眠, 此外, 骨中的缺氧和间质流体微环境在乳腺癌细胞定植和存活/休眠中起着重要的调控作用, 因此, 利用微流控芯片独特的骨组织微环境模拟特性^[33-39]和高通量药物筛选的优势^[42-43], 有望发展出新的体外测试平台, 筛选出针对乳腺癌骨转移早期治疗的抗肿瘤药物或化合物.

尽管如此, 利用微流控芯片进行抗乳腺癌骨转移药物高通量筛选仍面临挑战. 首先, 实现骨微环境模拟的复杂性 with 操作简便性之间的平衡问题不容忽视. 为了获得更加符合人体骨组织生理微环境的微流控芯片模型, 除了构建与乳腺癌骨转移相符的细胞共培养之外, 模拟I型胶原和羟基磷灰石构成的坚硬且具有弹性的3D生化微环境^[51]、缺氧和间质流体的生物物理微环境对研究细胞相互作用和药物作用效果必不可少^[36]. 而上述微环境的模拟将显著增加器官芯片的复杂性, 使芯片实际操作和控制变得困难^[43]. 其次, 芯片细胞培养和药物作用的高通量与结果检测高通量之间的平衡是另一个值得关注的问题, 决定了药物筛选的高通量是否确实可以实现. 目前大多数微流控芯片与高通量检测技术(如高分辨率质谱技术、酶联免疫吸附测定技术)结合存在难度, 高通量成像技术(如GE Health公司开发的IN Cell Analyzer 6000激光共聚焦成像分析系统、Molecular Devices公司开发的ImageXpress Microconfocal共聚焦高内涵成像系统)的发展将有利于微流控芯片高通量药物筛选的发展^[50, 52]. 第三, 结果的灵敏性和可靠性尤其值得关注. 微流控芯片的细胞用量少、体积小, 常常会引起与检测灵敏度相关的技术问题^[43]. 不同的乳腺癌骨转移模型之间往往存在很大差异, 能否作为可重复性好、结果稳定可靠的临床筛选药物工具还有待商榷^[53].

总体而言, 微流控芯片通过细胞共培养和微环境控制, 能够很好地模拟骨组织的微环境特征和乳腺癌骨转移的病理特征^[33-39], 并通过特定的结构实现高通量药物筛选^[42-43], 将为抗乳腺癌骨转移药物筛选提供更多机遇. 与此同时, 也不能忽视当前微流控芯片技术的局限性. 微流控技术的发展方向, 在保持其有效模拟微环境特性的同时, 要实现操作简便性、检测高通量和灵敏性的突破, 将微流控技术与3D打印技术相结合构建肿瘤球和控制肿瘤微环境, 将是一个切实可行的策略^[54-56].

5 结语与展望

乳腺癌骨转移是造成乳腺癌患者死亡的主要原因, 严重威胁中国乃至世界范围内女性的健康和生命. 目前临床治疗方法虽能延缓乳腺癌骨转移的发展, 但不能有效改善患者生存率. 结合当前蓬勃发展的微流控芯片技术, 能否发现乳腺癌骨转移的新机制, 为乳腺癌骨转移的预防和治疗提供有效的策略? 能否为抗肿瘤药物的筛选提供新思路和新方法, 切实可行地提高药物筛选效率和降低成本? 诸多问题摆在研究者面前.

基于微流控芯片技术在乳腺癌骨转移研究和药物筛选中具备的优势和面临的挑战, 致力于提升微流控芯片的微环境控制技术, 在优化骨微环境模拟有效性的同时降低芯片操作的难度, 并将芯片自身细胞培养/药物筛选的高通量特点与检测技术方法的高通量有机结合, 提高检测结果的灵敏性和可靠性, 将极大地推动乳腺癌骨转移的机制研究和药物开发. 此外, 将患者的组织样本与微流控芯片技术相结合, 有望为患者建立个性化的治疗方案.

致谢 感谢西北工业大学空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室人员的支持.

参 考 文 献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, *et al.* Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin*, 2016, **66**(2): 115-132
- [2] Romero-Moreno R, Curtis K J, Coughlin T R, *et al.* The CXCL5/CXCR2 axis is sufficient to promote breast cancer colonization during bone metastasis. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 4404
- [3] Johnson R H, Chien F L, Bleyer A. Incidence of breast cancer with distant involvement among women in the United States, 1976 to 2009. *JAMA*, 2013, **309**(8): 800-805
- [4] Zheng H, Bae Y, Kasimir-Bauer S, *et al.* Therapeutic antibody targeting tumor- and osteoblastic niche-derived jagged1 sensitizes

- bone metastasis to chemotherapy. *Cancer Cell*, 2017, **32**(6): 731-747
- [5] Zhang H, Lyden D. Bone voyage-osteoblasts remotely control tumors. *Science*, 2017, **358**(6367): 1127-1128
- [6] Devignes C S, Aslan Y, Brenot A, *et al.* HIF signaling in osteoblast-lineage cells promotes systemic breast cancer growth and metastasis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, **115**(5): 992-1001
- [7] Croucher P I, McDonald M M, Martin T J. Bone metastasis: the importance of the neighbourhood. *Nat Rev Cancer*, 2016, **16**(6): 373-386
- [8] Roodman G D. Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med*, 2004, **350**(16): 1655-1664
- [9] Jeon J S, Bersini S, Gilardi M, *et al.* Human 3D vascularized organotypic microfluidic assays to study breast cancer cell extravasation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(1): 214-219
- [10] Bersini S, Jeon J S, Dubini G, *et al.* A microfluidic 3D *in vitro* model for specificity of breast cancer metastasis to bone. *Biomaterials*, 2014, **35**(8): 2454-2461
- [11] Kwapiszewska K, Michalczuk A, Rybka M, *et al.* A microfluidic-based platform for tumour spheroid culture, monitoring and drug screening. *Lab Chip*, 2014, **14**(12): 2096-2104
- [12] Murakami M A, Weinstock D M. Cancer models: the next best thing. *Nature*, 2017, **549**(7670): 39-41
- [13] Stewart E, Federico S M, Chen X, *et al.* Orthotopic patient-derived xenografts of paediatric solid tumours. *Nature*, 2017, **549**(7670): 96-100
- [14] Whitesides G M. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 2006, **442**(7101): 368-373
- [15] Huh D, Torisawa Y, Hamilton G A, *et al.* Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips. *Lab Chip*, 2012, **12**(12): 2156-2164
- [16] Makhoul I, Montgomery C O, Gaddy D, *et al.* The best of both worlds—managing the cancer, saving the bone. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, **12**(1): 29-42
- [17] Fluegen G, Avivar-Valderas A, Wang Y, *et al.* Phenotypic heterogeneity of disseminated tumour cells is preset by primary tumour hypoxic microenvironments. *Nat Cell Biol*, 2017, **19**(2): 120-132
- [18] Gawrzak S, Rinaldi L, Gregorio S, *et al.* MSK1 regulates luminal cell differentiation and metastatic dormancy in ER(+) breast cancer. *Nat Cell Biol*, 2018, **20**(2): 211-221
- [19] Aguirre-Ghiso J A, Ossowski L, Rosenbaum S K. Green fluorescent protein tagging of extracellular signal-regulated kinase and p38 pathways reveals novel dynamics of pathway activation during primary and metastatic growth. *Cancer Res*, 2004, **64**(20): 7336-7345
- [20] Wang H, Yu C, Gao X, *et al.* The osteogenic niche promotes early-stage bone colonization of disseminated breast cancer cells. *Cancer Cell*, 2015, **27**(2): 193-210
- [21] Wang H, Tian L, Liu J, *et al.* The osteogenic niche is a calcium reservoir of bone micrometastases and confers unexpected therapeutic vulnerability. *Cancer Cell*, 2018, **34**(5): 823-839
- [22] Krzeszinski J Y, Wan Y H. New therapeutic targets for cancer bone metastases. *Trends Pharmacol Sci*, 2015, **36**(6): 360-373
- [23] Ell B, Kang Y. Snapshot: bone metastasis. *Cell*, 2012, **151**(3): 690-690.e1
- [24] Clézardin P. Therapeutic targets for bone metastases in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2011, **13**(2): 207
- [25] Wang H, Tian L, Goldstein A, *et al.* Bone-in-culture array as a platform to model early-stage bone metastases and discover anti-metastasis therapies. *Nat Commun*, 2017, **8**: 15045
- [26] Guy J B, Espenel S, Vallard A, *et al.* Evaluation of the cell invasion and migration process: a comparison of the video microscope-based scratch wound assay and the boyden chamber assay. *J Vis Exp*, 2017(129): e56337
- [27] Wong A K, LLanos P, Boroda N, *et al.* A parallel-plate flow chamber for mechanical characterization of endothelial cells exposed to laminar shear stress. *Cell Mol Bioeng*, 2016, **9**(1): 127-138
- [28] Martinive P, Defresne F, Bouzin C, *et al.* Preconditioning of the tumor vasculature and tumor cells by intermittent hypoxia: implications for anticancer therapies. *Cancer Res*, 2006, **66**(24): 11736-11744
- [29] Barkaoui A, Chamekh A, Merzouki T, *et al.* Multiscale approach including microfibril scale to assess elastic constants of cortical bone based on neural network computation and homogenization method. *Int J Numer Method Biomed Eng*, 2014, **30**(3): 318-338
- [30] Jang J H, Castano O, Kim H W. Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, **61**(12): 1065-1083
- [31] Johnson R W, Sowder M E, Giaccia A J. Hypoxia and bone metastatic disease. *Curr Osteoporos Rep*, 2017, **15**(4): 231-238
- [32] Rutkowski J M, Swartz M A. A driving force for change: interstitial flow as a morphoregulator. *Trends Cell Biol*, 2007, **17**(1): 44-50
- [33] Bersini S, Jeon J S, Dubini G, *et al.* A microfluidic 3D *in vitro* model for specificity of breast cancer metastasis to bone. *Biomaterials*, 2014, **35**(8): 2454-2461
- [34] Shin Y, Han S, Jeon J S, *et al.* Microfluidic assay for simultaneous culture of multiple cell types on surfaces or within hydrogels. *Nat Protoc*, 2012, **7**(7): 1247-1259
- [35] Jeon J S, Bersini S, Gilardi M, *et al.* Human 3D vascularized organotypic microfluidic assays to study breast cancer cell extravasation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(1): 214-219
- [36] Marturano-Kruik A, Nava M M, Yeager K, *et al.* Human bone perivascular niche-on-a-chip for studying metastatic colonization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, **115**(6): 1256-1261
- [37] Sano E, Mori C, Nashimoto Y, *et al.* Engineering of vascularized 3D cell constructs to model cellular interactions through a vascular network. *Biomicrofluidics*, 2018, **12**(4): 042204
- [38] Mei X T, Middleton K, Shim D S, *et al.* Microfluidic platform for studying osteocyte mechanoregulation of breast cancer bone metastasis. *Integr Biol*, 2019, **11**(4): 119-129
- [39] Hao S, Ha L, Cheng G, *et al.* A spontaneous 3D bone-on-a-chip for

- bone metastasis study of breast cancer cells. *Small*, 2018, **14**(12): e1702787
- [40] Mundy G R. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*, 2002, **2**(8): 584-593
- [41] Eduati F, Utharala R, Madhavan D, *et al.* A microfluidics platform for combinatorial drug screening on cancer biopsies. *Nat Commun*, 2018, **9**(1): 2434
- [42] Liu X Y, Zheng W F, Jiang X Y. Cell-based assays on microfluidics for drug screening. *ACS Sens*, 2019, **4**(6): 1465-1475
- [43] Esch E W, Bahinski A, Huh D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, **14**(4): 248-260
- [44] Wu J, Chen Q, Liu W, *et al.* Recent advances in microfluidic 3D cellular scaffolds for drug assays. *Trac Trends Anal Chem*, 2017, **87**: 19-31
- [45] Mulholland T, McAllister M, Patek S, *et al.* Drug screening of biopsy-derived spheroids using a self-generated microfluidic concentration gradient. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 14672
- [46] Li L L, Li Y Q, Shao Z X, *et al.* Simultaneous assay of oxygen-dependent cytotoxicity and genotoxicity of anticancer drugs on an integrated microchip. *Anal Chem*, 2018, **90**(20): 11899-11907
- [47] Au S H, Chamberlain M D, Mahesh S, *et al.* Hepatic organoids for microfluidic drug screening. *Lab Chip*, 2014, **14**(17): 3290-3299
- [48] Xu Z, Fang P L, Xu B Z, *et al.* High-throughput three-dimensional chemotactic assays reveal steepness-dependent complexity in neuronal sensation to molecular gradients. *Nat commun*, 2018, **9**(1): 4745
- [49] Lanz H L, Saleh A, Kramer B, *et al.* Therapy response testing of breast cancer in a 3D high-throughput perfused microfluidic platform. *BMC Cancer*, 2017, **17**(1): 709
- [50] Austin R. Cancer biology still needs physicists. *Nature*, 2017, **550**(7677): 431
- [51] Stevens M M, George J H. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science*, 2005, **310**(5751): 1135-1138
- [52] Fantuzzo J A, Robles D A, Mirabella V R, *et al.* Development of a high-throughput arrayed neural circuitry platform using human induced neurons for drug screening applications. *Lab Chip*, 2020, **20**(6): 1140-1152
- [53] Brancato V, Oliverira J M, Correlo V M, *et al.* Could 3D models of cancer enhance drug screening?. *Biomaterials*, 2020, **232**: 119744
- [54] Zhao L, Xiu J D, Liu Y, *et al.* A 3D printed hanging drop dripper for tumor spheroids analysis without recovery. *Sci Rep*, 2019, **9**(1): 19717
- [55] Liu Y, Liu Y Y, Zheng X N, *et al.* Recapitulating and deciphering tumor microenvironment by using 3D printed plastic brick-like microfluidic cell patterning. *Adv Health Mater*, 2020, **9**(6): e1901713
- [56] Zhao L, Liu Y Y, Liu Y, *et al.* Microfluidic control of tumor and stromal cell spheroids pairing and merging for three-dimensional metastasis study. *Anal Chem*, 2020, **92**(11): 7638-7645

The Application of Microfluidic Techniques on Bone Metastasis of Breast Cancer*

YU Tong-Yao¹⁾, YUAN Xi-Chen¹⁾, WANG Dong-En¹⁾, XU Hui-Yun¹⁾, YANG Peng-Fei¹⁾,
SHANG Peng^{1,2)**}, REN Li^{1)**}

(¹⁾Key Laboratory for Space Bioscience and Biotechnology, School of Life Science, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China;

²⁾Research & Development Institute in Shenzhen, Northwestern Polytechnical University, Shenzhen 518057, China)

Abstract A lack of effective treatments for patients suffered from breast cancer with bone metastasis are caused by limited *in vitro* models and unsuitable animal models, which leads to 70%~80% mortality rate. Microfluidics enabled bone-on-a-chip could facilitate the resemblance of the biochemical and biophysical microenvironment of native bone tissues, which could readily be incorporated with the occurrence of breast cancer so as to recapture the bone metastasis in a single chip. The microscale chip design could be scaled up with high throughput/content settings so as to uncover the molecular mechanisms existing in bone metastasis of breast cancer and screen effective drugs for it more efficiently. In this review, we first introduce the current mechanistic understanding on bone metastasis of breast cancer and existing drugs for this disease. We then summarized the microfluidic models used for recapturing bone metastasis phenomena. We also presented high throughput designs aiming for more efficient drug discovery and development. Lastly, we discuss the advantages and challenges existing in combining high throughput setting and microfluidic models aiming for effective drug screening targeting bone metastasis of breast cancer. Together, we hope to provide a clue on how effective treatments could be discovered in the future so as to decrease the high mortality rate of bone metastasis of breast cancer.

Key words microfluidic device, bone metastases of breast cancer, bone microenvironment, drug screening

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0168

* This work was supported by grants from Natural Science Basic Research Plan in Shaanxi Province of China (2018JM3005) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (3102016ZY041).

** Corresponding author.

REN Li. Tel: 86-29-88491613, E-mail: renli@nwpu.edu.cn

SHANG Peng. Tel: 86-29-88460391, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn

Received: June 1, 2020 Accepted: October 15, 2020