

DOI: 10.13376/j.cblls/2021115

文章编号: 1004-0374(2021)08-1047-07

基于微流控技术构建仿生骨芯片的研究进展

陈琛^{1#}, 田甜^{2#}, 毛红菊^{2*}, 刘慧颖^{1*}

(1 大连医科大学口腔医学院, 大连 116044; 2 中国科学院上海微系统与信息技术研究所传感技术联合国家重点实验室, 上海 200050)

摘要: 骨是由多种细胞和细胞外基质组成的具有多种功能的动态组织, 也是机体在运动中维持机械稳定、平衡力量分布和保护器官的关键组成部分。因此, 在体外建立骨组织模型是具有重要意义又极具挑战性的。基于微流控技术在细胞三维共培养上的发展, 以及可以模拟体内微环境, 精确控制流体和机械力的特点, 研究人员根据骨组织的生理学和病理学特征, 实现了血管化骨组织芯片、骨髓芯片、癌症骨转移芯片和骨细胞机械转导芯片的建立。该文对骨生理结构及骨相关疾病进行了概述, 着眼于微流控技术在骨模型构建中的优势及其应用, 为进一步建立更加完善的仿生骨芯片提供参考和依据。

关键词: 微流控; 器官芯片; 骨骼; 骨组织模型

中图分类号: TN4; O652.9; R68 文献标志码: A

Research progress of biomimetic bone chip based on microfluidic technology

CHEN Chen^{1#}, TIAN Tian^{2#}, MAO Hong-Ju^{2*}, LIU Hui-Ying^{1*}

(1 School of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China; 2 State Key Laboratory of Transducer Technology, Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China)

Abstract: Bone is a dynamic tissue with multiple functions composed of a variety of cells and extracellular matrix. It is a key component for the body to maintain mechanical stability, equilibrium force distribution and protect organs during exercise. Therefore, it is of great significance and challenge to establish bone tissue model *in vitro*. Based on the development of microfluidic technology in the three-dimensional co-cultivation of cells, as well as the ability to simulate the microenvironment in the body and precisely control the characteristics of fluid and mechanical forces, researchers based on the physiological and pathological characteristics of bone tissue, realized the establishment of vascularized bone tissue chip, bone marrow chip, cancer bone metastasis chip and bone cell mechanical transduction chip. This article outlines the physiological structure of bone and related diseases, focusing on the advantages and applications of microfluidic technology in the construction of bone model, so as to provide reference and basis for the further establishment of a more perfect biomimetic bone chip.

Key words: microfluidic; organ-on-chip; bone; bone tissue models

骨是一种具有多种功能的复杂组织, 可以在运动过程中提供机械稳定性, 支持和保护软组织, 储存钙磷维持体内矿物质的平衡, 并为骨髓和造血细胞的发育提供微环境^[1]。另外, 骨也是一个高度动态的组织, 在生物化学或机械信号作用下, 不断进行骨重塑, 更新损伤或老旧的骨组织, 以维持骨骼的健康^[2]。骨吸收与骨形成的平衡一旦破坏, 就会导致骨疾病的发生, 影响骨组织的功能^[3]。

微流控芯片具有体积小、高通量、低消耗的特点, 已经在生物医学研究领域得到广泛的应用^[4]。三维细胞培养微流控平台可以在体外调控化学物质

收稿日期: 2021-03-02; 修回日期: 2021-04-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(61871068)

*通信作者: E-mail: hjmao@mail.sim.ac.cn (毛红菊);
lhy04512000@dmu.edu.cn (刘慧颖)

#共同第一作者

的浓度梯度、模拟机械微环境、建立组织-组织界面研究细胞间的相互作用,避免了以往二维或三维细胞培养的缺点^[5-7]。另外,大多数动物实验是在啮齿类动物身上进行的,具有再现性好和复制率高的特点,但是,在生理和免疫系统上与人存在种属差异^[8],这些差异可能会导致体内临床前实验结果与人体内的不同。目前已有研究人员在体外建立肺^[9]、肾^[10]、血脑屏障^[11]、骨^[12]等器官芯片用于研究疾病的机制和进行药物的筛选。

本文概述了骨组织的解剖结构及生理功能;着重于微流控技术在骨模型构建中的应用,描述了血管化骨组织芯片、骨髓芯片、癌症骨转移芯片以及骨细胞机械转导芯片的设计及应用,为进一步建立更加完善骨组织芯片提供参考。

1 骨组织生理学及相关疾病

1.1 骨组织生理结构

从宏观来看,骨是由致密的外层皮质骨和疏松的内部松质骨组成的^[13],血管通过哈弗氏管(Haversian's canals)和伏克曼管(Volkman's canals)遍布骨骼。哈弗氏管从骨髓中获得血液,并由在骨之间输送血液的伏克曼管连接起来^[14]。由于密度和孔隙率的差别,皮质骨主要提供抗扭转和弯曲的能力,而松质骨则提供了机械弹性^[15]。皮质骨主要的功能单位为骨单元^[16],它是由围绕着哈弗氏管的含骨细胞的同心圆形板层组成^[17]。骨小梁则是松质骨的功能单位,可以根据骨受到的机械刺激而排列^[15]。

从微观来看,骨是由嵌入细胞外基质的多种细胞类型组成。主要是由4种细胞和两类细胞外基质组成。成骨细胞沿骨表面分布,合成骨基质的过程可以分为早期类骨质的形成和晚期的矿化^[18];在完成骨形成之后,可转化为骨衬细胞或作为骨细胞埋入骨基质或凋亡^[13, 19]。骨细胞可通过骨陷窝小管系统(LCS)中的树突状突起与骨表面细胞进行通信,使其在机械适应过程中能够响应外界的应激刺激,调节骨骼组成和分解代谢反应^[18]。转化成的骨衬细胞在骨重塑静止期单层覆盖骨表面,能有效地避免破骨细胞前体与骨表面在不恰当的时间接触,造成骨吸收。在骨重塑吸收阶段,破骨细胞吸附到骨组织表面分泌氢离子和酸性磷酸酶,降低骨吸收腔的pH值,溶解骨基质的矿化成分,并且可以分泌基质金属蛋白酶和组织蛋白酶家族成员,以消化骨基质的有机成分^[13, 16]。骨组织细胞外基质的有机成分主要为I型胶原蛋白和骨钙素等,为骨骼提供弹性

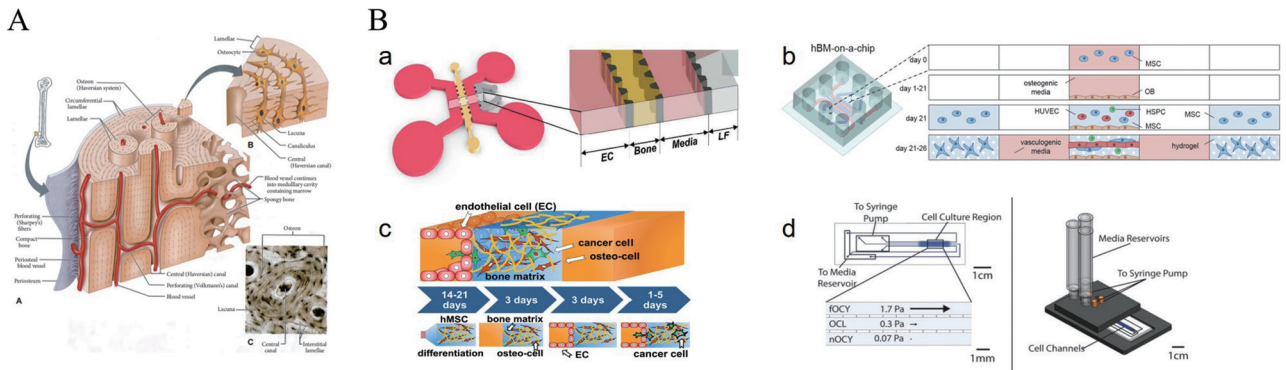
和柔韧性^[13]。而无机成分主要是由钙磷组成的羟基磷灰石,是骨骼的矿化部分,提高骨组织的密度与强度,从而保护其他器官及组织^[14]。

1.2 骨组织相关疾病

骨组织作为机体在运动中维持机械稳定、平衡力量分布和保护器官的关键组成部分,其健康程度严重影响人体的正常生理功能。代谢性骨病、炎性骨病和癌症骨转移等骨组织疾病会造成骨组织微结构破坏,以及骨质量和骨密度变化。代谢性骨病,如骨质疏松、骨质硬化和佝偻病,影响骨骼重塑过程,可以积极地或消极地改变骨平衡,导致过度骨形成或骨吸收^[3],其中骨质疏松作为最常见的骨代谢疾病更是在世界范围内影响着人们的骨骼健康。目前,50岁以上的50%女性和20%男性会发生脆性骨折^[20]。另外,骨转移是晚期嗜骨性癌症的主要并发症,包括乳腺癌、前列腺癌、肺癌和多发性骨髓瘤^[21],这些癌症转移可导致骨骼相关疾病发病率的显著提高,严重影响患者的生活质量。所以,需要对骨组织相关疾病进行研究,从而更好地在体外建立疾病模型,研究疾病机制并进行药物筛选。

2 微流控技术在骨模型构建中的应用

简单来说,通过微流控技术制作的器官芯片一般包含一个可以连续灌注的腔室,细胞培养于具有精细微结构的腔室中,并通过微流道进行灌流实现血液供应^[5]。该芯片可以在体外再现机体的多细胞结构、组织-组织界面、物理化学微环境和血液灌注,进行细胞间交流,并模拟体内微环境,从而构建组织和器官水平的整合功能单位,这些都是传统二维或三维细胞培养系统所无法实现的^[5, 22]。与此同时,微流控技术还能实现高分辨率的实时成像,并在体外进行功能性组织和器官环境中细胞的生化、遗传和代谢活动的体外分析^[23],该技术在促进组织发育、器官生理学和疾病病因学的研究方面亦具有巨大潜力。根据骨组织生理及病理特点,研究人员利用微流控可以建立组织间界面、模拟体内微环境和进行动态培养的特点,设计并建立了多种微流控骨组织器官芯片(图1)^[12, 24-27],包括血管化骨组织芯片、骨髓芯片、癌症骨转移芯片和骨细胞机械转导芯片等,用于研究骨组织生理及病理。现对目前主要的4种微流控骨组织器官芯片的芯片材料、芯片结构、细胞来源、细胞外基质/支架、细胞刺激和血管形成方面进行总结,具体内容见表1^[12, 25-32],为体外建立更加完善的骨组织模型提供参考。



A: 骨组织生理结构^[24]; B: 微流控骨组织芯片。a: 血管化骨组织芯片^[12]; b: 骨髓芯片^[25]; c: 癌症骨转移芯片^[26]; d: 骨髓细胞机械转导芯片^[27]。

图1 微流控技术在骨组织模型构建中的应用

2.1 血管化骨组织芯片

与心脏、肝脏和肾脏等软组织器官一样, 骨也需要稳定和持久的成熟血管网络才能维持正常的生理功能。骨组织包含两种主要的血管系统, 中央的哈弗式管和贯穿的伏克曼管^[33]。血管不仅为骨骼系统提供氧气和营养物质, 清除骨骼中的代谢物, 还为骨骼提供其他组织分泌的特定激素、生长因子和神经递质, 维持骨组织细胞的存活和刺激骨组织细胞的活动, 在骨重建和再生过程中起着核心作用^[34-36]。Kusumbe等^[37]在鼠的骨骼系统中发现了新的具有独特形态和功能特性的毛细血管亚型内皮细胞, 它能将血管生成与成骨相联系, 并且随着年龄增加该亚型内皮细胞数量减少, 这也解释了老年人骨骼再生潜力降低的原因。由此可见, 骨骼血管网络在骨组织的发育、再生和重塑中起着重要的作用, 也是建立骨组织模型过程中必须考虑的因素之一。

为了提高与体内的相似性, Jusoh等^[12]将三维微脉管系统与骨组织微环境相整合, 设计了一个由4个平行通道组成的微流控装置, 4个平行通道依次为血管、骨、介质和肺成纤维细胞。将纤维蛋白与羟基磷灰石(HA)纳米颗粒相结合作为细胞外基质, 模拟真实骨组织高度多孔和相互连接的结构, 利用肺成纤维细胞分泌的促血管生长因子和细胞外基质蛋白, 促进人脐静脉内皮细胞的形态发生, 并通过调节HA的含量来改变血管网络生成的数量。

Bersini等^[28]利用内皮细胞和间充质干细胞构建血管化骨组织模型, 分析了5种不同参数, 氧、细胞密度、比例、培养基、凝胶类型等对血管网络发育的影响; 由此, 通过在一个模型中的综合分析获得了各参数之间的协调相关性, 构建了一个体外

有效、可控、可调的血管化器官模型。该芯片验证了内皮细胞和骨细胞之间的相互作用在血管化骨组织的生成过程中重要性, 并证实了基质硬度和成分可以同时影响血管生成和成骨分化。因此, 血管化是一个由多种因素共同调节的过程, 分析每一个参数的具体作用都是至关重要的。

2.2 骨髓芯片

骨髓(BM)是复杂的器官, 对于造血、免疫稳态以及癌症转移至关重要^[25]。造血生态位是一个由多种细胞类型、分泌因子和细胞外基质(ECM)组成的复杂结构, 根据其结构和生物学特性可分为骨内膜生态位和血管周围生态位^[38], 它可以调节造血干细胞(HSC)的自我更新与分化成造血祖细胞(HPC)之间的平衡。HSC通过驻留在骨小梁骨髓中被称为干细胞生态位的特定微环境中而保持其干细胞的功能状态^[39]。

Torisawa等^[29]开发了一种先于体内构建, 再在微流控装置中灌流的骨髓芯片。该芯片用聚二甲基硅氧烷(PDMS)制作了一个中央圆柱形一端开口的腔体, 并用含有骨诱导脱钙骨粉和骨形态发生蛋白的I型胶原凝胶充填空腔, 植入小鼠皮下, 经过8周所形成的工程骨髓为一个包含骨髓的皮质骨和松质骨圆柱, 其造血细胞组成与天然骨髓相似。将芯片从小鼠体内取出后在微流控装置中进行灌流培养, 为研究骨髓药物反应和毒性分析, 以及体外造血和血液疾病提供了一种新方法。

体外模拟骨内膜和血管周围生态位的生理结构和相互作用对于理解骨髓的复杂性非常重要。骨内膜生态位主要由成骨细胞和破骨细胞组成^[40], 成骨细胞能够分泌细胞外基质, 并且可以向HSC和

表1 微流控骨组织模型总结

研究领域	芯片材料	芯片结构	细胞来源	细胞外基质 / 支架	细胞刺激	血管	参考文献
血管化骨组织芯片	PDMS	平行通道	HUVEC、LFs (肺成纤维细胞)	纤维蛋白凝胶、羟基磷灰石 (HA) 颗粒	流体控制、机械力刺激 (基质硬度)	微血管网络	[12]
骨髓芯片	PMMA	腔室型 多孔膜	HUVEC、hMSC、hMSC-OB 通过移植小鼠体内获得造血细胞	纤维蛋白、I 型胶原凝胶 含有骨诱导脱钙骨粉和骨形态发生蛋白 (BMP2 和 BMP4) 的 I 型胶原凝胶	流体控制、梯度产生 流体控制	微血管网络 充满血液的骨髓结构	[28] [29]
	PDMS	平行通道 多孔膜	HUVEC、hBMSC、hBM CD34 ⁺ HSPCs MC3T3-E1、MDA-MB-231	纤维蛋白、I 型胶原凝胶 无	流体控制 流体控制	微血管网络 无	[25] [30]
癌症骨转移芯片	PDMS	平行通道	HUVEC、hBMSC、MDA-MB-231	I 型胶原凝胶	梯度产生	血管屏障	[26]
	PDMS、玻璃	腔室型	HUVEC、hBMSC、MDA-MB-231	天然脱细胞骨基质	梯度产生	微血管网络	[31]
	PDMS	平行通道	MLO-Y4、RAW264.7	无	机械力刺激 (流体剪切力)	无	[27]
	PDMS	腔室型	hES-MPs (人胚胎干细胞来源的间充质祖细胞)	polyHIPE	机械力刺激 (流体剪切力)	无	[32]

HPC 提供可溶性和表面结合信号。血管周围生态位则是由内皮细胞和间充质干细胞或周细胞建立的。Nelson 等^[25] 设计了一个包含骨内膜、中央骨髓和血管周围生态位的骨髓芯片。该芯片在中央通道接种间充质干细胞，诱导分化 21 天后，在 PDMS 表面形成了矿物质基质，并表达了骨内膜生态位的细胞因子和细胞外基质特征；随后在水凝胶中添加内皮细胞和间充质干细胞，在“骨内膜”表面形成了一个相互连接的血管网络。用此方法建立的骨髓芯片能够更好地用于研究骨髓生理学、正常和受损的造血功能，以及癌症转移和多发性骨髓瘤等疾病。

2.3 癌症骨转移芯片

癌症转移的关键是特定的癌细胞倾向于归巢于特定的次级器官^[41]。侵袭和转移是一个复杂的、多步骤的过程，由遗传和生化因素决定^[42]。尽管转移在临床上具有重要意义，但目前研究的主要内容集中在导致原发性肿瘤发生的癌变上，对于转移过程仍有许多内容尚待了解^[43]。骨骼是转移性癌症的常见部位^[44-45]，尤其是乳腺癌和前列腺癌^[46]，会导致严重的骨骼并发症，包括脊髓或神经根压迫、恶性高钙血症、病理性骨折和骨痛。扩散的肿瘤细胞可以处于长期静止状态，并最终被重新激活以诱导转移性复发^[47]。一旦癌细胞被重新激活，病变可以是溶骨性病变 (扩散肿瘤细胞通过增强破骨细胞分化刺激溶骨而进入骨表面)、成骨性病变 (肿瘤细胞分泌直接影响成骨细胞和破骨细胞关系的因子来改变骨重塑) 或混合病变。乳腺癌通常导致溶骨性转移 (73%)，而前列腺癌导致成骨性转移 (68%)^[45, 48]。此外，确诊为临床骨转移后的中位生存期约为 2 年^[49]，这也说明了预防或治疗骨转移的临床重要性。由于缺乏研究骨转移过程，以及细胞因子和信号通路驱动的模式，临床一般很少治愈，并且大多数是选择姑息治疗^[45]。以往的体内外模型无法完全模拟人类癌细胞、内皮细胞和组织实质细胞之间相互作用。为了实现这一目标，已有研究人员利用微流控技术在体外模拟骨组织微环境建立癌症骨转移芯片。

Bersini 等^[26] 通过利用人骨髓间充质干细胞 (hBM-MSC) 和内皮细胞重建血管化骨组织微环境系统，研究转移性乳腺癌细胞的跨内皮迁移并监测其在骨样基质中的行为。骨组织体外三维模型的建立是首先通过对 hBM-MSC 进行 2~3 周的成骨分化诱导，并接种在微流控设备中沉积细胞外基质，再播种内皮细胞，形成覆盖培养基通道的单层屏障，最后加入乳腺癌细胞，并监测其浸润能力和微转移。

这个模型的优点在于该系统利用成骨分化细胞分泌的蛋白质作为细胞外基质,而不是通过添加趋化因子,更好地模拟体内复杂的细胞信号转导。Hao等^[30]基于同步生长透析原理(即低相对分子质量营养物质和代谢废物通过透析膜不断交换,而大量蛋白质在底腔中积累),建立了一个具有三维矿化胶原的骨组织芯片,用于研究乳腺癌的转移。该芯片利用透析膜将芯片分为上腔的培养基腔和下腔的细胞生长腔,将MC3T3-E1细胞接种在下腔中经过蚀刻处理的玻璃盖玻片上培养720 h,在芯片中形成了85 μm厚的与自然组织三维结构相似的含有大量矿化胶原纤维的典型成熟成骨细胞组织。该芯片具有小型化、高通量的特点,提高了癌细胞与骨基质的相互作用的机会,并且能够观察到体内证实的癌症骨转移的独特标志。Marturano-Kruik等^[31]将内皮细胞和间充质干细胞培养于天然脱细胞骨基质中,并暴露于生理学相关的流速和氧梯度下,建立一个不需要添加血管生长因子的具有持久血管网络的骨血管周围生态位芯片,以研究乳腺癌细胞的早期转移以及定植,预测患者对抗癌药物的反应。

2.4 骨细胞机械转导芯片

骨组织在生物体的整个生命周期中都表现出机械敏感的特性,并能适应环境中普遍存在的机械因素。骨骼的这种适应机械刺激的功能被描述为沃尔夫定律(Wolff's Law)^[24,50]。骨骼是由不断地暴露在各种机械刺激下(如剪切力、张力、压力和压缩力)的各种细胞组成^[51],例如,内皮细胞和骨细胞分别暴露在血管和骨陷窝小管系统的剪切力下。骨细胞和成骨细胞都对负荷诱导的液体流动有反应^[52],骨细胞对机械刺激最为敏感。机械负荷诱导了小管网络中的流体流动,在骨细胞内引起各种反应^[53-54],可以将骨弯曲或拉伸产生的应力信号转化为生物信号;而成骨细胞最终分化为骨细胞,可以作为研究骨细胞对剪切力反应的有利的实验模型。这些机械反应细胞通常会将机械刺激转化为生化反应,改变细胞内和细胞外结构。由于在所有机械敏感细胞中,骨细胞被深深地埋在富含ECM的矿化骨组织中,相对独特^[55]。因此,骨细胞非常适合适应细胞/基质相互作用中的动态机械敏感变化。Yan等^[56]采用流体剪切力刺激MLO-Y4类骨细胞。在机械刺激后,细胞及细胞核变大,丝状伪足增多,微丝更加密集且排列方向与流通方向一致,Wnt3a和β-连环蛋白(catenin)基因和蛋白质的表达增加,抑制细胞晚期凋亡。Jin等^[52]通过实验发现在经过流体剪切力处

理后,MC3T3-E1的细胞骨架、细胞和细胞核的形态和体积发生显著变化,并伴有黏附性和结构蛋白的基因和蛋白质表达升高。

由于在体外构建骨骼模型需要考虑三维微环境和流体流动这两个因素,Bahmace等^[32]利用多孔聚合高内相乳液(polyHIPE)制备三维支架,并与生理流体剪切力相结合设计了微流控成骨芯片,对人胚胎干细胞来源的间充质干细胞进行3周培养,检测并对比不同流体流动状态下细胞的代谢活性、成骨分化和矿化基质沉积的变化。成骨细胞-骨细胞通信系统的主要机械传感网络可以与破骨细胞一起根据机械负荷来改变骨的质量和结构,从而重新排列骨组织。为研究这些细胞之间的相互作用,Middleton等^[27]设计了一个微流控灌注共培养系统,将位于相邻通道内生理距离的不同细胞群暴露在不同水平的流体剪切力下,促进不同通道之间的细胞间通讯,用来研究破骨细胞前体对机械刺激或非刺激骨细胞产生的信号的反应,进而研究破骨细胞对骨细胞机械敏感性的调节。

3 展望

近几年,微流控器官芯片在体外器官模型构建中得到广泛应用,作为传统细胞培养和动物实验的替代品,在进行药物和毒理学研究方面具有很大的潜力。但是,目前骨组织芯片的设计多专注于研究骨的某种功能,建立理想的骨组织芯片仍具有挑战性,尤其是在同时涵盖骨组织的解剖结构和生理功能方向。在细胞的组成上,要考虑细胞间的相互作用,包括成骨细胞、破骨细胞、内皮细胞、造血干细胞和间充质干细胞等;细胞外基质应该尽可能由接近天然骨细胞外基质的生物来源材料制成,或者可以通过无支架的方法;在建立器官模型时还应包含免疫反应、血管生成、机械刺激等因素。

当然,微流控器官芯片也有它的局限性。首先,PDMS具有良好的透光性、透气性和生物相容性,但它能吸附疏水性小分子,可能导致有效药物浓度和药理活性降低;其次,还需要提高技术稳定性,为了在一个月或更长时间内实现器官芯片的最佳功能,必须对细胞、细胞外基质、流速和氧梯度维持等因素进行调整。但是,由于其具有传统三维培养系统不具备模拟体内结构及微环境的特点,相信在未来随着微流控技术和细胞生物学的不断发展和研究,能将微流控器官芯片应用到更广泛的医疗领域当中。

[参 考 文 献]

- [1] Grabowski P. Physiology of bone. *Endocr Dev*, 2015, 28: 33-55
- [2] Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological bone remodeling: systemic regulation and growth factor involvement. *Physiology (Bethesda)*, 2016, 31: 233-45
- [3] Owen R, Reilly GC. *In vitro* models of bone remodelling and associated disorders. *Front Bioeng Biotechnol*, 2018, 6: 134
- [4] Volpatti LR, Yetisen AK. Commercialization of microfluidic devices. *Trends Biotechnol*, 2014, 32: 347-50
- [5] Bhatia SN, Ingber DE. Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 760-72
- [6] Yum K, Hong SG, Healy KE, et al. Physiologically relevant organs on chips. *Biotechnol J*, 2014, 9: 16-27
- [7] Huh D, Torisawa YS, Hamilton GA, et al. Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips. *Lab Chip*, 2012, 12: 2156-64
- [8] Esch EW, Bahinski A, Huh D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14: 248-60
- [9] Huh D, Matthews BD, Mammoto A, et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science*, 2010, 328: 1662-8
- [10] Qu Y, An F, Luo Y, et al. A nephron model for study of drug-induced acute kidney injury and assessment of drug-induced nephrotoxicity. *Biomaterials*, 2018, 155: 41-53
- [11] Maoz BM, Herland A, FitzGerald EA, et al. A linked organ-on-chip model of the human neurovascular unit reveals the metabolic coupling of endothelial and neuronal cells. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 865-74
- [12] Jusoh N, Oh S, Kim S, et al. Microfluidic vascularized bone tissue model with hydroxyapatite-incorporated extracellular matrix. *Lab Chip*, 2015, 15: 3984-8
- [13] Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2008, 3 Suppl 3: S131-9
- [14] Rao RR, Stegemann JP. Cell-based approaches to the engineering of vascularized bone tissue. *Cytotherapy*, 2013, 15: 1309-22
- [15] Scheinpflug J, Pfeiffenberger M, Damerau A, et al. Journey into bone models: a review. *Genes (Basel)*, 2018, 9: 247
- [16] Lopes D, Martins-Cruz C, Oliveira MB, et al. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. *Biomaterials*, 2018, 185: 240-75
- [17] Currey JD. The structure and mechanics of bone. *J Mater Sci*, 2012, 47: 41-54
- [18] Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, et al. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 421746
- [19] Kohli N, Ho S, Brown SJ, et al. Bone remodelling *in vitro*: where are we headed?: —a review on the current understanding of physiological bone remodelling and inflammation and the strategies for testing biomaterials *in vitro*. *Bone*, 2018, 110: 38-46
- [20] Oden A, McCloskey EV, Kanis JA, et al. Burden of high fracture probability worldwide: secular increases 2010-2040. *Osteoporos Int*, 2015, 26: 2243-8
- [21] Qiao H, Tang T. Engineering 3D approaches to model the dynamic microenvironments of cancer bone metastasis. *Bone Res*, 2018, 6: 3
- [22] Tehranirokh M, Kouzani AZ, Francis PS, et al. Microfluidic devices for cell cultivation and proliferation. *Biomicrofluidics*, 2013, 7: 51502
- [23] Sontheimer-Phelps A, Hassell BA, Ingber DE. Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19: 65-81
- [24] Park H, Lim DJ, Sung M, et al. Microengineered platforms for co-cultured mesenchymal stem cells towards vascularized bone tissue engineering. *Tissue Eng Regen Med*, 2016, 13: 465-74
- [25] Nelson MR, Ghoshal D, Mejias JC, et al. A multi-niche microvascularized human bone marrow (hBM) on-a-chip elucidates key roles of the endosteal niche in hBM physiology. *Biomaterials*, 2021, 270: 120683
- [26] Bersini S, Jeon JS, Dubini G, et al. A microfluidic 3D *in vitro* model for specificity of breast cancer metastasis to bone. *Biomaterials*, 2014, 35: 2454-61
- [27] Middleton K, Al-Dujaili S, Mei X, et al. Microfluidic co-culture platform for investigating osteocyte-osteoclast signalling during fluid shear stress mechanostimulation. *J Biomech*, 2017, 59: 35-42
- [28] Bersini S, Gilardi M, Arrigoni C, et al. Human *in vitro* 3D co-culture model to engineer vascularized bone-mimicking tissues combining computational tools and statistical experimental approach. *Biomaterials*, 2016, 76: 157-72
- [29] Torisawa YS, Spina CS, Mammoto T, et al. Bone marrow-on-a-chip replicates hematopoietic niche physiology *in vitro*. *Nat Methods*, 2014, 11: 663-9
- [30] 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: e1702787
- [31] Marturano-Kruik A, Nava MM, Yeager K, et al. Human bone perivascular niche-on-a-chip for studying metastatic colonization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 1256-61
- [32] Bahmaee H, Owen R, Boyle L, et al. Design and evaluation of an osteogenesis-on-a-chip microfluidic device incorporating 3D cell culture. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 557111
- [33] Osaki T, Sivathanu V, Kamm RD. Vascularized microfluidic organ-chips for drug screening, disease models and tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol*, 2018, 52: 116-23
- [34] Filipowska J, Tomaszewski KA, Niedzwiedzki L, et al. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning. *Angiogenesis*, 2017, 20: 291-302
- [35] Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, et al. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med*, 2005, 352: 1959-66
- [36] Fang TD, Salim A, Xia W, et al. Angiogenesis is

- required for successful bone induction during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res*, 2005, 20: 1114-24
- [37] Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature*, 2014, 507: 323-8
- [38] Lilly AJ, Johnson WE, Bunce CM. The haematopoietic stem cell niche: new insights into the mechanisms regulating haematopoietic stem cell behaviour. *Stem Cells Int*, 2011, 2011: 274564
- [39] Lévesque JP, Helwani FM, Winkler IG. The endosteal 'osteoblastic' niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Leukemia*, 2010, 24: 1979-92
- [40] Tamma R, Ribatti D. Bone niches, hematopoietic stem cells, and vessel formation. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 151
- [41] Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 453-8
- [42] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144: 646-74
- [43] Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 2006, 127: 679-95
- [44] Li S, Peng Y, Weinhandl ED, et al. Estimated number of prevalent cases of metastatic bone disease in the US adult population. *Clin Epidemiol*, 2012, 4: 87-93
- [45] Suva LJ, Washam C, Nicholas RW, et al. Bone metastasis: mechanisms and therapeutic opportunities. *Nat Rev Endocrinol*, 2011, 7: 208-18
- [46] Quayle L, Ottewill PD, Holen I. Bone metastasis: molecular mechanisms implicated in tumour cell dormancy in breast and prostate cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, 2015, 15: 469-80
- [47] Giancotti FG. Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. *Cell*, 2013, 155: 750-64
- [48] Thibaudeau L, Taubenberger AV, Holzapfel BM, et al. A tissue-engineered humanized xenograft model of human breast cancer metastasis to bone. *Dis Model Mech*, 2014, 7: 299-309
- [49] Holen I, Nutter F, Wilkinson JM, et al. Human breast cancer bone metastasis *in vitro* and *in vivo*: a novel 3D model system for studies of tumour cell-bone cell interactions. *Clin Exp Metastasis*, 2015, 32: 689-702
- [50] Prisby RD. Mechanical, hormonal and metabolic influences on blood vessels, blood flow and bone. *J Endocrinol*, 2017, 235: R77-100
- [51] da Silva Madaleno C, Jatzlau J, Knaus P. BMP signalling in a mechanical context — implications for bone biology. *Bone*, 2020, 137: 115416
- [52] Jin J, Jaspers RT, Wu G, et al. Shear stress modulates osteoblast cell and nucleus morphology and volume. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 8361
- [53] Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*, 2001, 22: 2581-93
- [54] Klein-Nulend J, Bacabac RG, Mullender MG. Mechanobiology of bone tissue. *Pathol Biol (Paris)*, 2005, 53: 576-80
- [55] Sato T, Verma S, Andrade CDC, et al. A FAK/HDAC5 signaling axis controls osteocyte mechanotransduction. *Nat Commun*, 2020, 11: 3282
- [56] Yan Z, Wang P, Wu J, et al. Fluid shear stress improves morphology, cytoskeleton architecture, viability, and regulates cytokine expression in a time-dependent manner in MLO-Y4 cells. *Cell Biol Int*, 2018, 42: 1410-22