



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Microecology—Perspective

人体胃肠道-菌群相互作用的工程学研究模型

Marc Mac Giolla Eain^{a,b}, Joanna Baginska^a, Kacy Greenhalgh^a, Joëlle V. Fritz^a,
Frederic Zenhausern^b, Paul Wilmes^{a,*}

^a Luxembourg Centre for Systems Biomedicine, University of Luxembourg, Esch-sur-Alzette, L 4362, Luxembourg

^b Center for Applied Nanobioscience and Medicine, University of Arizona, Tucson, AZ 85721, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 November 2016

Revised 12 January 2017

Accepted 13 January 2017

Available online 21 February 2017

关键词

微生物

微流体

肠道芯片

HuMiX

摘要

研究宿主-胃肠道微生物的相互作用已经成为管理人类健康和疾病的关键组成部分。微生理系统的发展正在为研究人员提供前所未有的对于这种复杂关系的获取和理解。这些系统结合了微型工程、微流体和细胞培养的优点,来创建人类肠道中普遍存在的环境条件。在这里我们提出的HuMiX(人类微生物交联对话)平台,是一个利用这种多学科方法提供具有代表性的人体胃肠道的体外模型系统,用于研究宿主-微生物分子的相互作用。我们总结了使用该平台获得的概念验证结果,强调其对于大大增强我们对宿主-微生物相互作用了解的潜力,且其可能对药物、食品和营养以及医疗保健行业产生的巨大影响。同时讨论了这些技术面临的一些关键问题和挑战。

© 2017 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of the Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

微生物群,包括细菌、古细菌和真菌,它们代表了地球上最小的生物。尽管它们形态微小,但它们在包括人体在内的许多系统的管理中起着至关重要的作用。在数量方面,人体内和人体表面细菌细胞的丰度被认为与实际组成人类身体的细胞数量具有相同的数量级[1]。微生物群落定植在人类不同组织的表面,其中,大部分定植在胃肠道(GIT)中,在这里它们是这个极端多样化和动态生态系统的主要成分。该系统的状态取决于多种因素,包括宿主遗传学、免疫状态和饮食[2]。

许多研究已经强调胃肠道微生物在消化、营养、代谢以及大多数重要的疾病发病机制中起了关键作用

[3–7]。更具体地说,现代高分辨率分子分析已经提示生态失调(在胃肠道微生物生态学中的不平衡)与一系列终发性疾病(包括肥胖症[8]、糖尿病[9]、结肠直肠癌[10]、神经性疾病[11]和过敏性疾病[12])之间有一定的联系。一个关键的研究方法是宏基因组学,即从肠道微生物提取基因组DNA并进行测序。这种方法提供了一种快速、精确的方式来分类和识别肠道内的单个微生物。除了宏基因组学之外,还有一些功能性方法,如元转录组学、元蛋白质组学和代谢组学,它们在空间和时间的特定点提供了存在于微生物群落中的转录物、蛋白质和代谢物的定性和定量信息[13–15]。这些元分析提供了一种有用的方式,能够识别、量化和功能性描述存在于肠道内的微生物的特点。然而,为了将人类微生物群的差异与

* Corresponding author.

E-mail address: paul.wilmes@uni.lu

不同的人类疾病进行因果关联, 允许测试和验证来源于宏组织学研究结果的实验是必须的[16]。换句话说, 除了在体内收集的样品分析衍生的关联之外, 现在至关重要是对宿主-微生物相互作用的基本分子机制以及它们在免疫调节、感染和代谢中的作用进行详细的机理的理解。

虽然可以在体内使用动物模型[17]以及在体外研究宿主-微生物的相互作用, 如使用Transwell系统[18], 但已经确定这些模型在生理学方面并不能代表人胃肠道内的条件[19]。此外, 从经济和时间的角度来看, 动物模型是非常昂贵的[20]。因此, 非常需要开发能够创建人类胃肠道内存在的生理条件的体外溶液, 用于快速的、可重复的和高通量的实验。

微型工程、生物材料和电子工业方面的最新进展提供了一种替代方法, 可用来研究人-胃肠道微生物分子的相互作用。更具体地说, 通过由半导体和电子工业开发的微细加工技术应用于流体自动化, 构建体外系统, 使其更加接近肠道内和其他器官内存在的条件, 这样的平台被称为“器官芯片”。当与相关的宿主细胞接种时, 可以利用微流体来模拟在体外所见的特定的生理条件。这些基于微流体的系统提供了优于传统细胞培养技术的诸多优点, 包括3D培养环境、长期实验供应、实验灵活性更大、以受控方式向细胞运送营养物和其他化学物质的能力、大大降低试剂需求、精确调整时间和空间的氧和pH梯度的能力、轻柔培养环境及具有高通量实验的能力。

已经开发了许多基于微流体的体外肠道模型, 并且这些模型涉及在水凝胶[21]、基于PDMS的芯片[22,23]或聚酰胺膜[24]中的人肠上皮细胞的培养。然而, 这些系统不能替代体内环境, 因为它们不能重现肠道内的动

态微环境, 尤其是普遍存在于人-微生物界面的不同的流动变化规律。此外, 这些方法不能创建用于培养肠道内典型细菌菌种的厌氧条件(它们仅允许培养有氧生长的益生菌菌株), 它们无法向上皮细胞的基础界面提供恒定的营养供应, 就如在体内是通过动脉血液供应而不是模块化的, 从而不允许将快速提取共培养后的细胞用于详细的分子分析[25]。以下部分介绍了HuMiX——一种基于模块化微流体的人-微生物共培养系统。该平台克服了先前描述的体外模型的诸多局限, 同时提供了一种更具代表性的人类胃肠道模型。

2. HuMiX

HuMiX(人类微生物交联对话)平台, 如图1所示[25], 由三个平行的微流体通道组成。这些层叠和定向的通道作为微室, 分别称为微生物室、上皮细胞室和灌注室[图1(c)]。每个微室具有专用的入口和出口, 其允许相关细胞系的接种和通过专用细胞生长培养基的灌注来精确控制每个微室内的理化条件。此外, 通过专用的出口从各个微室收集洗脱液, 用于后续分析。通道(200 mm×4 mm×0.5 mm)由聚合物垫圈激光切割, 并遵循独特的螺旋结构, 这种结构优化系统的占用面积。这些通道通过半透性聚碳酸酯膜将彼此分开。聚碳酸酯膜的孔径大小有50 nm和1 μm, 是根据它们的特定功能来区分的。50 nm孔径的聚碳酸酯膜将微生物室和上皮室隔开, 阻止微生物渗透至上皮室, 而1 μm孔径的聚碳酸酯膜将灌注室与上皮室分开, 并允许细胞生长培养基扩散到上皮室, 如图1(c)所示。另外, 在共培养期间, 聚碳酸酯膜被黏蛋白、50 nm孔径膜和胶原蛋白、1 μm孔径膜包被, 这有助于细胞黏附到膜上。在培育期间,

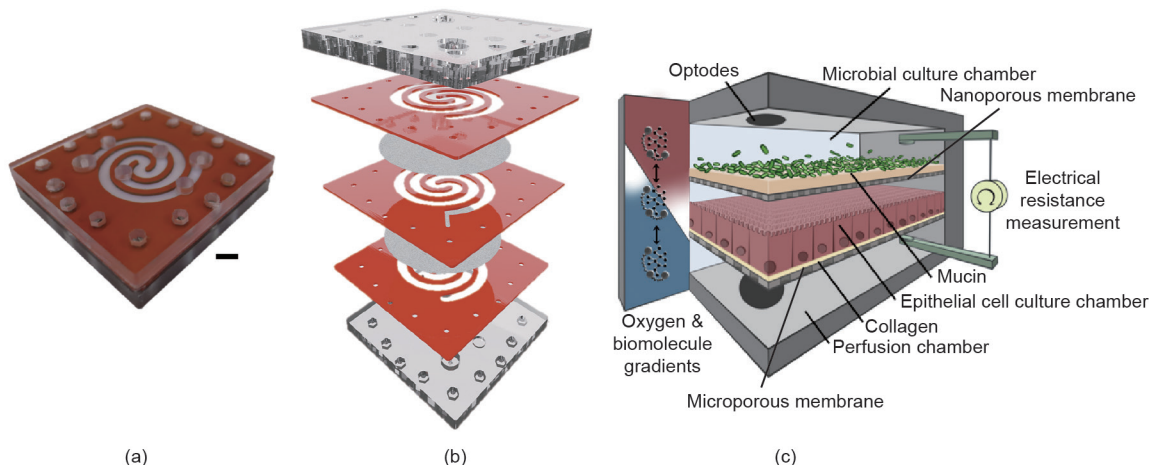


图1. HuMiX平台。(a) HuMiX平台的组装图像(比例尺等于1 cm); (b) HuMiX平台的分解图; (c) HuMiX平台关键特征的注释示意图[25]。

利用一个蠕动泵通过微生物室和灌注室灌注DMEM培养基(Dulbecco's modified eagle medium), 来模拟肠道内的蠕动运动和管腔内的流体流动, 从而创造一个能够代表健康完整的上皮屏障的环境。装置内的环境通过一系列非侵入性氧传感器常规监测, 而装置内细胞的生长和分化利用可插入装置中的标准跨上皮电阻(TEER)测量电极来测量。关于该平台及其操作参数更详细的描述可在文献[25]中找到。以下详细描述了在HuMiX平台人和细菌细胞的共培养, 并阐明了HuMiX成功创建人胃肠道微环境的能力。

2.1. 概念验证

为了验证HuMiX平台能够成功共培养人和微生物细胞以及建立更接近人胃肠道环境条件的能力, 用人上皮结直肠腺癌细胞系Caco-2接种在上皮室, 而用益生菌鼠李糖乳杆菌GG(LGG)接种在微生物室。人细胞在包被胶原蛋白的微孔膜上生长, 并由其通过灌注室与富氧DMEM培养基接触的基底侧供应细胞, 因此流体可模拟动脉血液供给, 同时在上皮细胞微室中为细胞生长提供无剪切环境。上皮细胞分化通过测量Caco-2细胞层的TEER[图2(a)][25]和显微镜观察[图2(b)、(c)]来评价。一旦建立融合细胞层(这通常发生在接种后6天), 微生物室将会接种厌氧条件下生长的LGG细菌细胞。微生物室

由细菌培养基灌注, 细菌培养基由充入 N_2 以将 O_2 浓度降低至低于1%的继续生长的DMEM培养基组成。重要的是, HuMiX的模块结构便于在特定共培养之后进入个体细胞团。这样允许从培养的细胞中提取细胞内生物分子, 并获得DNA、RNA和蛋白质组分, 以便随后进行高分辨率的omic分析[26]。共培养细胞的活性是通过荧光显微镜来判断的, 如图2(c)、(d)所示, 并且这样的分析证明在共培养24 h后, 在任一细胞团中没有诱导细胞毒性效应。三个微室的洗脱液的明显差异支持每个微室内不同微环境的假设, 如图2(e)所示。需氧(21%的溶解 O_2)和厌氧(0.1% O_2)DMEM培养基的同步和连续灌注, 考虑到在体内的氧梯度的建立和维持, 分别通过灌注室和微生物室进行。测量水平 $5.43 \pm 0.14\%$ 和 $<0.8\%$, 与那些分别在人肠道组织(即约4.6%) [27]和在细胞腔(即约0.2%) [28]的水平相当。图2及文献[25]中的数据阐明了HuMiX在与胃肠道环境类似的环境中, 成功共培养人和微生物细胞的能力。为了进一步证明该平台的有效性, 对附加的细菌和人细胞接种物, 尤其是拟杆菌(*B.caccae*)和CCD-18Co, 分别进行了研究。此外, 使用存在于灌注微室中的原代 $CD4^+$ T细胞进行共培养。这些研究更明确的细节以及结果可以在文献[25]中找到。虽然结果证明HuMiX能够成功共培养不同类型人类细胞和微生物细胞, 但值得注意的是单个细胞类型仅能部分代表整个

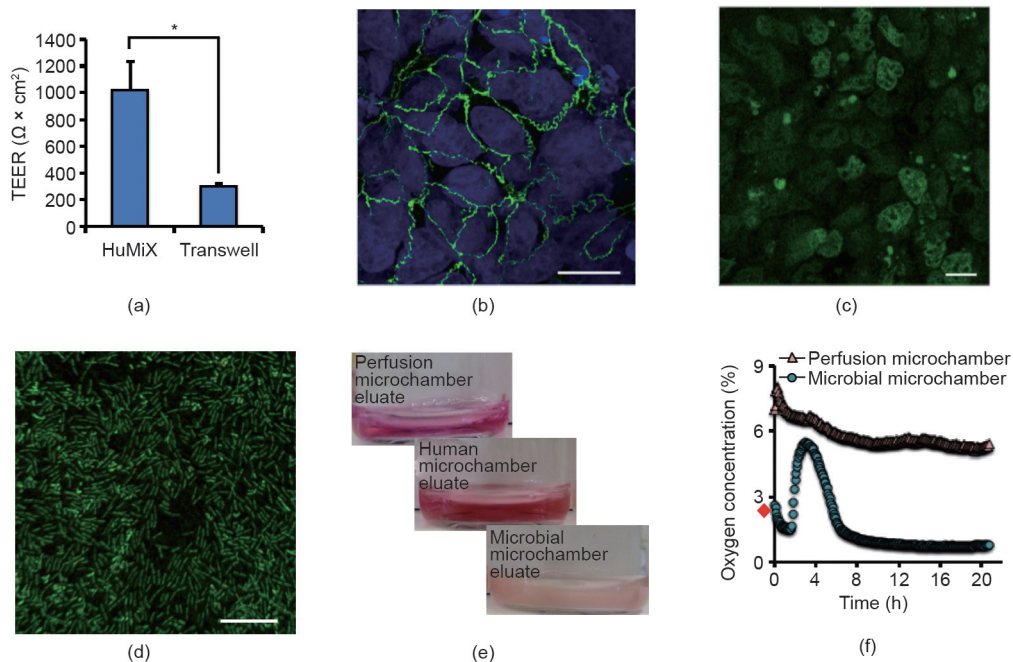


图2. HuMiX平台维持人和微生物细胞共培养能力的证据。(a) 在HuMiX中形成的上皮细胞层的跨上皮电阻(TEER)测量基准, 对照来自标准Transwell系统的测量。误差线表示s.e.m ($n=3$)。 (b) 在厌氧条件下与LGG共培养24 h后, Caco-2细胞中的紧密连接蛋白封闭(绿色)的免疫荧光显微镜图像。细胞核用4,6-二脒基-2-苯基吡啶染色并显示为蓝色。 (c) 培养24 h后的Caco-2细胞系的活-死染色的荧光显微镜图像。 (d) 培养24 h后LGG的活-死染色的荧光显微镜图像。活细胞呈绿色, 而死细胞呈红色(比例尺, 10 μ m)。 (e) 在24 h共培养后, 在HuMiX中来自三个独立微室的样品洗脱液。 (f) 在接种LGG后灌注室和微生物室内的溶解氧浓度水平(%)。◆表示微生物室的接种前水平[25]。

胃肠道组织的复杂性。

作为概念验证实验的一部分，我们建立不同的培养方案来确定基于HuMiX的细胞示值读数是否与先前的体内数据一致。研究表明，HuMiX实验与之前从人类和动物[25]获得的体内数据之间有高度一致性，从而进一步说明作为人-胃肠道微生物的代表模型的HuMiX平台的有效性。此外，在不同的实验条件下观察到细胞反应方面的有趣差异。更具体地说，在与厌氧条件下生长的LGG共培养后的人细胞的几种分子标志物被认为发生了显著变化。这些变化包括促炎性细胞因子的表达减少，如CCL20和IL-8，在胃肠癌中已知相关基因的差异表达，如SOX4和TPD52，具有迄今未知功能但之前发现在癌症研究背景下有趣的miRNA，如miR 483-3p和miR 1229-3p，还有三羧酸循环(TCA)中间物丰度的增加，如富马酸盐和柠檬酸盐，这提示了微生物群在调节初级能量代谢中的作用，见图3。

这里总结的和文献[25]中提出的结果说明，HuMiX能够建立与人类胃肠道中相似的生理条件，并且提供了一种方式来进一步理解在宿主-微生物的相互作用中起作用的基本机制。平台的灵活性和稳健性允许其模拟肠道内宿主-微生物之间的相互作用。因此，该平台有可能用于各种应用领域，特别是那些与制药、食品和营养工业相关的领域。

关于此平台在未来如何用于研究宿主对存在于肠道内的共生/病原体的免疫应答以及确定饮食在宿主-微生物的动力学方面的影响(通过前体益生菌和益生菌的不同组合)，用以下实例进行说明。

2.2. Immuno-HuMiX

肠道菌群与肠道免疫系统之间处于恒定的内稳态关

系，且这种平衡的破坏与疾病的发病机制相关[29]。因此，在肠道菌群、肠道上皮细胞和免疫系统之间的复杂相互作用中的因果关系的建立，是基于微生物组的成功策略的发展来维持人类健康的一个关键步骤。基于最初使用CD4⁺T细胞[25]的共培养实验，我们现在扩大HuMiX平台来分析人肠道中免疫系统与肠道菌群之间的相互作用。在Immuno-HuMiX模型中，我们能够共培养胃肠道微生物、人上皮细胞和从健康志愿者分离的人原代免疫细胞，在被半渗透膜隔离的三个不同的微室中培养，如图4所示。第一步，将从健康志愿者的新鲜血液中分离的人外周血单核细胞(PBMC)整合到灌注微室中，以便监测细菌和上皮细胞对免疫细胞的影响，反之亦然。之前描述的肠道中CD4⁺T细胞的多个子集，其代表一个重要部位，用于胃肠道内外参与免疫应答细胞的产生和调节。肠道Th1和Th17细胞群对于细胞内细菌和病毒的适应性反应是必需的。我们现在正在研究在肠道免疫中重要的T细胞群体(如Th1和Th17细胞)与典型的肠道细菌菌株之间的相互作用。因此，Immuno-HuMiX是研究微生物群-免疫系统相互作用的新方法，并且会大大增强我们对于单个细菌菌株如何影响人类健康和疾病的理解。

2.3. Nutri-HuMiX

为了理解膳食成分和肠道细菌在人类生理学上的作用，对于饮食、微生物和人类细胞之间的相互作用的机理的深入理解是必需的。作为人类胃肠道的表现模型，HuMiX模型特别适合回答这些问题，因为它允许细菌菌株与人类肠道细胞在特定实验条件下长时间地共培养。为了研究膳食成分对肠道微生物的影响，除了其对人类生理学的潜在协同或叠加效应外，我们已经成功地利用

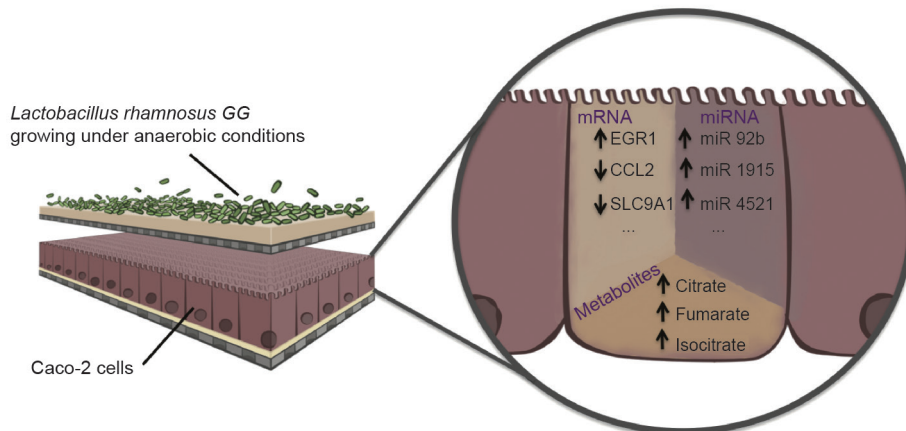


图3. 与厌氧条件下生长的鼠李糖乳杆菌GG共培养24 h后，在Caco-2细胞中发现差异丰富的基因、miRNA和代谢物的实例。

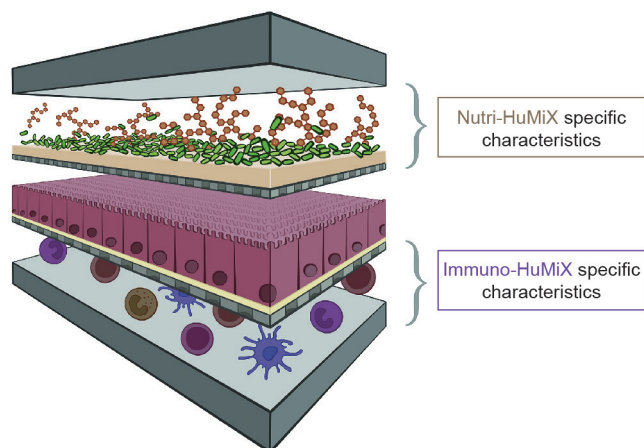


图4. Nutri-HuMiX和Immuno-HuMiX平台的示意图。在Nutri-HuMiX模型中富含纤维的培养基通过细菌室灌注，在Immuno-HuMiX模型中将初级免疫细胞接种到灌注室。

HuMiX模型来模拟不同的膳食干预。对于Nutri-HuMiX的概念验证，如图4所示，两种益生菌菌株LGG和*B. caccae*由标准的外源流出培养基(SIEM)灌注，由大豆益生元补充，并与上皮微室中的人Caco-2细胞共培养。初步结果显示，人上皮细胞系Caco-2中的基因表达模式在共培养24 h后发生改变。更具体地说，当与其细胞仅由DMEM单独补充相比时，我们发现潜在的肿瘤抑制基因在这些条件下被上调。目前我们正在扩大这项研究，包括不同的原始结直肠癌细胞系，T20代表II期、T18代表IV期，在Nutri-HuMiX平台，具体目的是检查不同益生元组合对癌细胞的影响，如纤维素。从这些研究获得的信息和知识将很可能在食品、生物制药和医疗领域中产生显著影响，并进一步突出在诸如HuMiX的平台中体外实验的必要性和潜力。

3. 结束语和未来挑战

在肠道微生物群及其对人宿主的影响方面存在大量未开发的信息。这些信息涉及形成人类生理学的许多过程和相互作用。在过去的十年里，科学和工程领域的重大进步，使研究人员对于胃肠道微生物生态学及其在人类健康和疾病发展中的作用获得了前所未有的见解。生物材料、微工程和细胞培养方面的突破使得体外平台能够创建，如基于微流体的设备，这可以提供更接近于人胃肠道的内部条件。

诸如HuMiX平台和其他器官芯片设备[30–32]，有许多潜在的应用领域。例如，制药工业在道德和经济方面面临相当大的压力，需寻找替代方法来加速药物开发

过程，以更安全、更具成本效益和符合道德标准的方式开展研究。与新药开发相关的高失败率，在某种程度上可能是由于使用非典型动物模型和对于与药物代谢相关的微生物群缺乏考虑。其他面临类似挑战的行业是食品和营养工业，其中某些膳食成分的功效尚未通过机械论证明。使用微生物作为疾病的生物标志物，或得到可以特异性修复个体内生态失调以致可能治愈疾病的调节剂，具有相当大的潜力[20]。然而，为了获得在健康人或患者胃肠道中发挥作用的特定的微生物动力学，有必要了解以某种方式驱动肠道生态系统的相互作用。因此，诸如HuMiX平台，在这里人们可以研究单个细菌和局部细菌对宿主生理学的影响，这个平台对我们了解基本知识和进一步理解至关重要。尽管发达国家主要研究人类肠道中宿主–微生物的相互作用，但是HuMiX的独特架构，即其共同培养这种接近但彼此完全分开的个体细胞系或细胞团的能力，也使它成为一个先进的工具，用来研究人类肠道微生物的基本过程。例如，在HuMiX中建立稳定群落的生态学可能被实验干扰，导致类似于生态失调的状态。因此，可以详细研究过渡态，如研究与生态失调相关疾病的早期生物标志物。

微细加工技术和微流体的应用代表了重建人–胃肠道微生物界面复杂特征的很有希望的手段之一。这些方法允许在细胞水平发生的结构、力学和化学传递的精确创建。然而，还有很多技术和工业上的挑战需要解决，以便更好地创建胃肠道内的理化环境。其中，最重要的是需要更好的生物材料。由于其生物相容性和快速成型的潜力，大多数现有装置由聚合物如聚二甲基硅氧烷(PDMS)制造。然而，PDMS对有机溶剂的耐受性较差，且其吸收小的疏水性分子，如药物和荧光染料，以至于限制了它们在严格实验中的应用，因此需要对其进行化学修饰或开发其他底物材料。另外，从工业制造的角度来看，难以可靠地再现临床验证研究(需要可扩展、高通量的系统)所需的由大规模PDMS制造的装置。其他工程方面的挑战包括：能够测量和检测来自细胞的光学、电、机械和化学信号的传感器的开发和集成，以及微流体阀和泵的集成，以更准确地创建胃肠道蠕动运动和相关的生理条件。在微生物测定中还需要进一步发展，包括其他的细胞类型，如衍生自人诱导的多能干细胞，其可以进一步促进我们对健康人和患者肠道中宿主–微生物相互作用的理理解。

通过微流体学、微生物学和细胞生物学等学科的结合，已经回答了胃肠道内关于宿主–微生物相互作用的

许多问题。然而，这只是一个令人兴奋的开始，需要进一步的发展以在体外条件下更好地模拟体内环境。这些进展需要充分利用HuMiX平台和其他这样的平台的潜力，以便对宿主-微生物分子的相互作用提供急需的全面了解。

致谢

作者衷心感谢卢森堡大学卢森堡系统生物医学研究中心(LCSB)和亚利桑那大学应用纳米生物科学与医学中心(ANBM)的所有工作人员的支持，特别感谢Audrey Frachet (LCSB)，Linda Wampach (LCSB)和Matthew Barrett (ANBM)的图表。Marc Mac Giolla Eain和Joanna Baginska的工作由概念验证拨款(PoC/15/11014639)支持，Paul Wilmes和Joëlle V. Fritz的工作由CORE项目(CORE/14/BM/8066232)支持。HuMiX的概念验证工作得到了ATTRACT项目(ATTRACT/A09/03)、CORE项目(CORE/11/BM/1186762)、欧洲联盟编程的神经退行性疾病项目(INTER/JPND/12/01)、概念验证项目(PoC15/11014639)、公司措施移动性补助资助(12/AM2c/05)和AFR博士后项目(AFR/PDR2013-1/BM/5821107)的资助。以上所有这些都由卢森堡国家研究基金(FNR)资助。

Compliance with ethics guidelines

Authors Frederic Zenhausern and Paul Wilmes have corresponding patent applications, which are currently pending PCT Pub. Nos. WO2013EP055712, WO2013EP065718, and WO201344253; US Provisional App. No. 62/166940; and PCT App. NO. PTC/EP2016/062024.

Marc Mac Giolla Eain, Joanna Baginska, Kacy Greenhalgh, Joëlle V. Fritz, Frederic Zenhausern, and Paul Wilmes declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

References

- [1] Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol* 2016;14(8):e1002533.
- [2] Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2015;31(1):69–75.
- [3] Pflughoeft KJ, Versalovic J. Human microbiome in health and disease. *Annu Rev Pathol* 2012;7(1):99–122.
- [4] Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(34):13780–5.
- [5] Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2012;13(10):701–12.
- [6] Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, Letulle S, Langella P, et al. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One* 2011;6(1):e16393.
- [7] Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Health Dis* 2015;26:26191.
- [8] Shen J, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med* 2013;34(1):39–58.
- [9] Naseer MI, Bibi F, Alqahtani MH, Chaudhary AG, Azhar EI, Kamal MA, et al. Role of gut microbiota in obesity, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2014;13(2):305–11.
- [10] Azcarate-Peril MA, Sikes M, Bruno-Bárcena JM. The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;301(3):G401–24.
- [11] Scheperjans F, Aho V, Pereira PA, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord* 2015;30(3):350–8.
- [12] Panzer AR, Lynch SV. Influence and effect of the human microbiome in allergy and asthma. *Curr Opin Rheumatol* 2015;27(4):373–80.
- [13] Roume H, Muller EE, Cordes T, Renaut J, Hiller K, Wilmes P. A biomolecular isolation framework for eco-systems biology. *ISME J* 2013;7(1):110–21.
- [14] Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, Schultz PG, Lesley SA, Peters EC, et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(10):3698–703.
- [15] Heintz-Buschart A, May P, Laczny CC, Lebrun LA, Bellora C, Krishna A, et al. Integrated multi-omics of the human gut microbiome in a case study of familial type 1 diabetes. *Nat Microbiol* 2016;2:16180.
- [16] Fritz JV, Desai MS, Shah P, Schneider JG, Wilmes P. From meta-omics to causality: experimental models for human microbiome research. *Microbiome* 2013;1(1):14.
- [17] Hapfelmeier S, Lawson MA, Slack E, Kirundi JK, Stoel M, Heikenwalder M, et al. Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science* 2010;328(5986):1705–9.
- [18] Parlesak A, Haller D, Brinz S, Baeuerlein A, Bode C. Modulation of cytokine release by differentiated CACO-2 cells in a compartmentalized coculture model with mononuclear leucocytes and nonpathogenic bacteria. *Scand J Immunol* 2004;60(5):477–85.
- [19] Nguyen TLA, Vieira-Silva S, Liston A, Raes J. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis Model Mech* 2015;8(1):1–16.
- [20] Arnold JW, Roach J, Azcarate-Peril MA. Emerging technologies for gut microbiome research. *Trends Microbiol* 2016;24(11):887–901.
- [21] Sung JH, Yu J, Luo D, Shuler ML, March JC. Microscale 3-D hydrogel scaffold for biomimetic gastrointestinal (GI) tract model. *Lab Chip* 2011;11(3):389–92.
- [22] Kim HJ, Huh D, Hamilton G, Ingber DE. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. *Lab Chip* 2012;12(12):2165–74.
- [23] Kim HJ, Li H, Collins JJ, Ingber DE. Contributions of microbiome and mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human gut-on-a-chip. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113(1):E7–15.
- [24] Marzorati M, Vanhoecke B, De Ryck T, Sadaghian Sadabad M, Pinheiro I, Possemiers S, et al. The HMI™ module: a new tool to study the host-microbiota interaction in the human gastrointestinal tract *in vitro*. *BMC Microbiol* 2014;14:133.
- [25] Shah P, Fritz JV, Glaab E, Desai MS, Greenhalgh K, Frachet A, et al. A microfluidics-based *in vitro* model of the gastrointestinal human-microbe interface. *Nat Commun* 2016;7:11535.
- [26] Roume H, Muller EE, Cordes T, Renaut J, Hiller K, Wilmes P. A biomolecular isolation framework for eco-systems biology. *ISME J* 2013;7(1):110–21.
- [27] Sheridan WG, Lowndes RH, Young HL. Intraoperative tissue oximetry in the human gastrointestinal tract. *Am J Surg* 1990;159(3):314–9.
- [28] Schmidt TM, Kao JY. A little O₂ may go a long way in structuring the GI microbiome. *Gastroenterology* 2014;147(5):956–9.
- [29] Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009;9(5):313–23.
- [30] Lee PJ, Hung PJ, Lee LP. An artificial liver sinusoid with a microfluidic endothelial-like barrier for primary hepatocyte culture. *Biotechnol Bioeng* 2007;97(5):1340–6.
- [31] Jang KJ, Suh KY. A multi-layer microfluidic device for efficient culture and analysis of renal tubular cells. *Lab Chip* 2010;10:36–42.
- [32] Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin HY, Ingber DE. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science* 2010;328(5986):1662–8.