



刘亚龄, 博士生导师, 华西医院精准医学转化研究中心副主任, 国家精准医学产业创新中心类器官芯片平台主任, 海纳特聘教授。曾获美国国家自然科学基金杰出青年教授奖, 是美国医学与生物工程院Fellow, 美国机械工程师协会Fellow, 美国国家发明家科学院Senior Member。已在*Nat Commun*、*Lab Chip*、*Anal Chem*等一流期刊发表论文100余篇, 被引6 000余次。研究领域涵盖微流控、器官芯片、类器官、人工智能(AI)、生物力学与先进制造等, 并致力于这些技术在肿瘤精准治疗中的应用。在医学与工程技术交叉领域拥有超过16年的研究经验, 长期从事器官芯片的产学研结合与成果转化。

基于类器官芯片的仿生组织器官模型构建

宋柯^{1,2,3} 吴兴涵^{1,2} 刘亚龄^{1,2*}

(¹精准医学转化研究中心, 四川大学华西医院, 成都 610041; ²国家精准医学产业创新中心, 成都 610041;

³MERLN再生医学技术研究所, 马斯特里赫特大学, 马斯特里赫特 6200 MD)

摘要 仿生组织器官模型旨在通过模拟人体组织器官的生物、物理及化学特性, 构建在结构与功能上与天然组织高度相似的实验体系。其最终目标是深化对组织发育、疾病机制和药物反应的理解。类器官芯片技术结合了类器官与器官芯片, 近年来在仿生组织和器官的构建中展现了显著的潜力。其通过芯片制造技术、微流控技术和检测技术的结合, 能够精确模拟及检测人体器官的动态生理特征, 为疾病研究、药物筛选和再生医学提供了重要工具。尽管类器官芯片技术在单器官模型的应用上取得了一定进展, 但要实现更加复杂的多器官交互模型以及肿瘤模型的构建仍面临挑战。该综述回顾了构建仿生组织器官模型的一般策略, 强调了其重要组成元素, 讨论了类器官芯片技术在单组织(如肝脏、心脏、上皮组织等)器官模型中的应用, 以及其在多器官互作模型(包括二联及三联以上互作模型)中的发展, 探讨了其在模拟各组织器官细胞行为和生理功能中的优势与不足。此外, 该文还详细阐述了类器官芯片在肿瘤模型中的应用, 强调了类器官芯片在抗肿瘤药物筛选和个性化治疗中的潜力, 并围绕类器官芯片模型构建指出了目前的挑战、展望了未来的发展方向, 旨在促进其医学转化, 为仿生组织器官模型构建提供新思路。

关键词 类器官; 微流控; 类器官芯片; 人体芯片; 精准医学

Constructing Biomimetic Tissue and Organ Models Using Organoid-on-a-Chip

SONG Ke^{1,2,3}, WU Xinghan^{1,2}, LIU Yaling^{1,2*}

(¹Precision Medicine Translational Research Center, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China;

²National Industrial Innovation Center of Precision Medicine, Chengdu 610041, China; ³MERLN Institute for Technology-Inspired Regenerative Medicine, Maastricht University, Maastricht 6200 MD, the Netherlands)

收稿日期: 2025-06-15

接受日期: 2025-08-21

国家自然科学基金(重点项目)(批准号: 82530071)资助的课题

*通信作者。E-mail: yaling.liu@gmail.com

Received: June 15, 2025

Accepted: August 21, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Key Program) (Grant No.82530071)

*Corresponding author. E-mail: yaling.liu@gmail.com

Abstract Biomimetic tissue and organ models are engineered to replicate the biological, physical, and chemical properties of natural tissues and organs. These model systems serve as experimental platforms to provide critical insights into tissue development, disease progression, and pharmacological response. OoC (organoid-on-a-chip) technology, which integrates organoids with organ-on-a-chip platforms, has shown considerable promise in the construction of biomimetic tissues and organs in recent years. By combining chip fabrication, microfluidics, and detection technologies, OoC systems allow for the precise simulation of the dynamic features of human tissues and organs, providing essential tools for disease research, drug screening, and regenerative medicine. Despite advancements in the application of OoC technology in single-tissue and organ models, challenges remain in developing more complex multi-organ interaction models and constructing tumor models. This review examines strategies for constructing biomimetic tissue and organ models, discusses the application of OoC technology in single-tissue and organ models, such as the liver, heart, and epithelium, as well as multi-organ interaction models, including two-tissue and three-tissue OoC. It also discusses the advantages and limitations of OoC in simulating organ-specific cellular behaviors and physiological functions. Additionally, the application of OoC technology in tumor models is detailed, emphasizing its potential in anti-tumor drug screening and personalized medicine. The review concludes with an outlook on current challenges and future development directions of OoC models, aiming to promote OoC model translational potential and provide new insights for the construction of biomimetic tissue and organ models.

Keywords organoid; microfluidic; organoid-on-a-chip; human-on-a-chip; precision medicine

仿生组织器官模型旨在通过模拟人体组织器官的微环境,以复现其生理功能,这些模型为组织工程、疾病研究、药物测试以及细胞和分子水平的探索提供了有力的工具。传统的仿生模型大致可以分为两类:体内模型(小鼠、大鼠、猪、羊等哺乳动物以及斑马鱼、果蝇等非哺乳动物模型)和体外模型[二维(two-dimensional, 2D)和三维(three-dimensional, 3D)细胞培养模型]。动物模型被广泛使用于临床前药物及医疗器械研究,然而,动物模型与人体生理存在巨大转化差距。如过去十年全球药企对新药研发的投资超千亿美元,但约91%的候选药物因临床失败折戟^[1-2],动物模型的固有局限(解剖结构、免疫反应、生物屏障、受体表达、基因多样性差异等)是重要原因。2025年美国食品药品监督管理局宣布将逐步取消单克隆抗体类药物强制动物实验,这进一步凸显开发人类组织器官和相关疾病仿生模型的重要性。

2D细胞模型被广泛运用于早期药物筛选,但其无法模拟体内细胞空间分布与密度,且其基因表达和药物响应显著不同于3D模型^[3]。相比于2D细胞模型,3D细胞模型可以保持自然细胞形状^[4],可构建复杂三维结构和动态微环境^[5]。其中,3D细胞模型中类器官的构建尤为引人注目。类器官的发展已在其他报道中有所论述^[6],通常认为类器官起源于1907

年WILSON等^[7]发现物理分离的海绵细胞可以重新聚集,自行组成一个新的功能完善的海绵。2009年,SATO等^[8]首次证明了单个Lgr5⁺肠道干细胞可以自行组织分化形成包含所有肠细胞类型的肠隐窝-绒毛结构,开启了类器官技术发展的新时代,在此基础上类器官模型成为区别于传统细胞系和异质动物模型的新型研究模型。尽管类器官模型在组织工程和药物开发中具有显著的优势,但模型的生物相似性仍不足,难以复现复杂的人体生理环境,特别是在多器官互作方面,如药物的转运和代谢途径往往涉及多个酶系统和组织器官(如肝与肾)的协同作用。

器官芯片模型指利用微流控等技术在芯片上模拟人体器官微结构和功能,构建不同生理环境(如组织灌注、环境动态变化,及多器官联动),也被称为“微生理系统”平台^[9]。其细胞来源可以是原代细胞、细胞系或干细胞,而“类器官芯片”特指将类器官整合到微流控芯片平台,既保留类器官的生物复杂性,又利用芯片微环境控制来提升类器官的成熟度、复杂性和功能。得益于组织工程和微加工技术的融合进展,在器官芯片中可实现细胞操控、细胞极性、直接的细胞间相互作用以及允许化学和电信号的传播,基于这些优势,早在2022年已推动首款基于临床前数据开发的药物(TNT005)进入FDA临床试验阶段^[10]。

类器官、器官芯片及类器官芯片技术的应用在国际上正在迅速发展,如美国哈佛大学所开发的肝脏-肾脏联合芯片、肿瘤组织芯片等已广泛应用于药物开发领域,荷兰Hubrecht研究所构建了多种类器官,包括近期成功构建的一种全新的胰腺类器官,涵盖胰腺中三种关键细胞类型(腺泡细胞、导管细胞、内分泌细胞)^[11]。我国在类器官和(类)器官芯片领域的布局较晚,但进步迅速,近年来在构建相关仿生模型用于药物筛选、代谢研究以及癌症治疗等领域研究取得了一定的进展,深入理解体外仿生组织器官模型的构建原理对推进我国疾病研究与创新药物研发至关重要。本文就如何构建体外仿生组织器官模型进行综述,聚焦类器官芯片关键技术,将首先围绕三维组织器官培养模型,介绍模型的构建策略,包括采用无支架和有支架方法,以及应用工程制造的方法。其次,本文重点讨论了类器官芯片工程技术的构建要点以及应用类器官芯片构建仿生组织器官的策略。最后,本文讨论了当前构建仿生组织器官的瓶颈和对未来方向的展望。

1 体外仿生组织器官模型构建

1.1 构建基于类器官的仿生组织的标准

细胞和模拟其天然生态位必要特征的基质是构建仿生模型两种至关重要的成分,为精准构建类器官以模拟人体组织,需要从细胞、基质以及其物理化学和生物功能出发以符合生物相似性标准(图1)。通常情况下,成体干细胞(adult stem cells, ASCs)、多能干细胞[如胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)]以及患者组织(如肿瘤)来源的细胞以单细胞或者聚集体的形式,在适当刺激或关键信号因子调控下,经历增殖、分化、迁移和自我更新,可构建模拟器官的关键功能、结构和生物学复杂性的组织^[12-14]。在此过程中,类器官需展示一系列与生物体类似的特征。(1) 物理化学特征,包括细胞外基质成分,化学物质/氧气浓度梯度(如肝脏从门静脉三联体到中央静脉的氧气和营养物质具备梯度分区^[15]),所生成类器官的形貌特征(如肝胆管类器官具备分枝状的导管结构,肾脏类器官具备肾小管和肾小球样结构等),以及机械强度的相似性等。(2) 生物响应特征,包括细胞种类的多样性,相应类器官的生物标志物,细胞/标志物的空间分布,类器官给药后药物

的吸收、分布、代谢和排泄(absorption, distribution, metabolism, excretion, ADME),电生理特性(细胞或组织的电学特性,如心肌细胞膜的静息与动作电位),以及干性(干细胞维持自我更新和多向分化的潜能)的保持等。(3) 动态变化特征,包括对外界刺激及损伤的响应、发育过程的相似性、自我更新、衰老和细胞信号转导(细胞对不同信号如机械信号和化学信号感应从而驱动细胞间通讯)能力等。具体的例子如ASCs来源的肠道类器官首先长成单层球体,然后发育出类似天然组织的上皮凸起隐窝结构,可形成类似天然组织的细胞类型,可以产生黏液,吸收和分泌生物分子,并表现出完整的上皮屏障^[16]。LG5被鉴定为肠道干细胞标志物,LGR5⁺干细胞则被发现可以激活诱导隐窝-绒毛结构。小肠隐窝类器官中存在的上皮细胞种类及比例被发现与肠道本身存在的种类比例相似,包括LGR5⁺干细胞、潘氏细胞、肠内分泌细胞、肠上皮细胞和杯状细胞^[8]。不同肠段(即十二指肠、空肠、回肠、结肠)都表现出结构和功能的多样性,肠隐窝类器官在培养中重现了所有细胞类型以及与天然组织中相同的寿命^[17],此外其转运功能也在Na⁺吸收和Cl⁻分泌中得到验证^[18]。然而肠类器官中肠上皮细胞和结肠细胞的寿命仅为5~7天,生成功能性绒毛较为困难,NIKOLAEV等^[19]则通过整合干细胞分化与工程技术手段,成功实现了小鼠肠道干细胞向管状可灌注组织的形态发生调控,其形成的隐窝和绒毛结构特征与天然肠道高度相似,该技术被进一步用于人体结肠和小肠组织模型构建^[20]。鉴于工程技术在调控类器官模型中的有效性,接下来我们将介绍如何应用不同工程技术策略构建类器官仿生组织。

1.2 构建基于类器官的仿生组织的策略

不同工程技术被应用于构建3D细胞模型,根据构建方式可分为四个策略:基于无支架、基于有支架、基于生物打印以及基于器官芯片的构建策略(图1)。无支架法依赖细胞的自组装能力,避免材料对细胞迁移、分化或者免疫反应的影响,简化模型构建过程。常见的类器官模型构建方法如下。(1) 细胞片法(cell sheet):通过响应性支持材料实现细胞无酶分离,形成致密细胞组织^[21],并以层层自组装形式模拟组织的层次结构(如心脏-内皮细胞片)^[22]。(2) 悬滴法(hanging-drop)、微孔法(microwell)和自组织法(self-assembly)以形成单个类球体/类器官:传统悬滴

法依赖手动操作,可能存在细胞换液困难和聚集松散的问题,更新的优化方案如微流控悬滴^[23]或增加模块化组件^[24]可显著改善这些缺陷。微孔法利用微孔板或微孔阵列提供空间限制、控制细胞聚集,从而形成均匀的三维结构,适合大规模药物筛选和定量分析^[25]。自组织法通过调节培养条件诱导细胞自动形成三维结构,其中包括以生物正交实验进行细胞膜修饰^[26]以及基因编辑改变细胞内源性信号^[27]用于促进单细胞黏附组装。(3) 类器官组装法(assembly): 以多种类器官组装形成组装体实现复杂组织结构,如自组装方式可形成3D皮质-运动组装体构建功能性人类神经回路^[28],以及声波组装可形成形状可控的脑皮质模型用于病毒检测^[29]。

有支架策略在于模拟细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的生物物理和生化特性,提供类器官结构支持,影响细胞的生长、分化和功能表达。支架基质包括天然聚合物及合成聚合物,其中基质胶(Matrigel)是最广泛运用于类器官培养的天然材料,神经类器官、肝脏类器官、肠道类器官、血管类器官、骨髓类器官等都被报道在基质胶中能够得到较好的生长和分化^[13,30-32]。但基质胶来源于 Engelbreth-

Holm-Swarm小鼠肉瘤细胞分泌的类似基底膜的凝胶,含有数千种复杂成分,存在批间差异,与人类组织ECM成分有较大差异,会引发人体免疫排斥^[33]。用于替换基质胶的支架材料通常包括三种:(1) 脱细胞基质^[34]和其他衍生蛋白^[35];(2) 凝胶形成的重组肽^[36];(3) 合成水凝胶^[36]。它们通常结合细胞黏附域或蛋白降解位点,如GJOEVSKI等^[36]将聚乙二醇作为水凝胶骨架,并使其功能化结合精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸用于细胞黏附和肠干细胞扩增,以及结合层粘连蛋白-111用于类器官成型,该水凝胶基质的物理化学特性与黏附因子的分布性可调,可诱导高纯度的肠道干细胞生长。然而对于刚性组织,如骨组织模型的构建,通常要选择一定刚性的支架,具备高力学特性,并支持骨类器官的矿化,如胶原蛋白/羟基磷灰石复合材料^[37]。同样对于软骨组织构建需要具有较高弹性和韧性的支架^[38]。对于复杂组织结构,如骨含有骨髓腔、松质骨、密质骨并且高度血管化,关节软骨含有透明软骨、钙化软骨和软骨下骨,模拟类似复杂组织结构需考虑不同的基质成分、力学特性和钙含量。

无支架和有支架的方式构成了类器官培养的

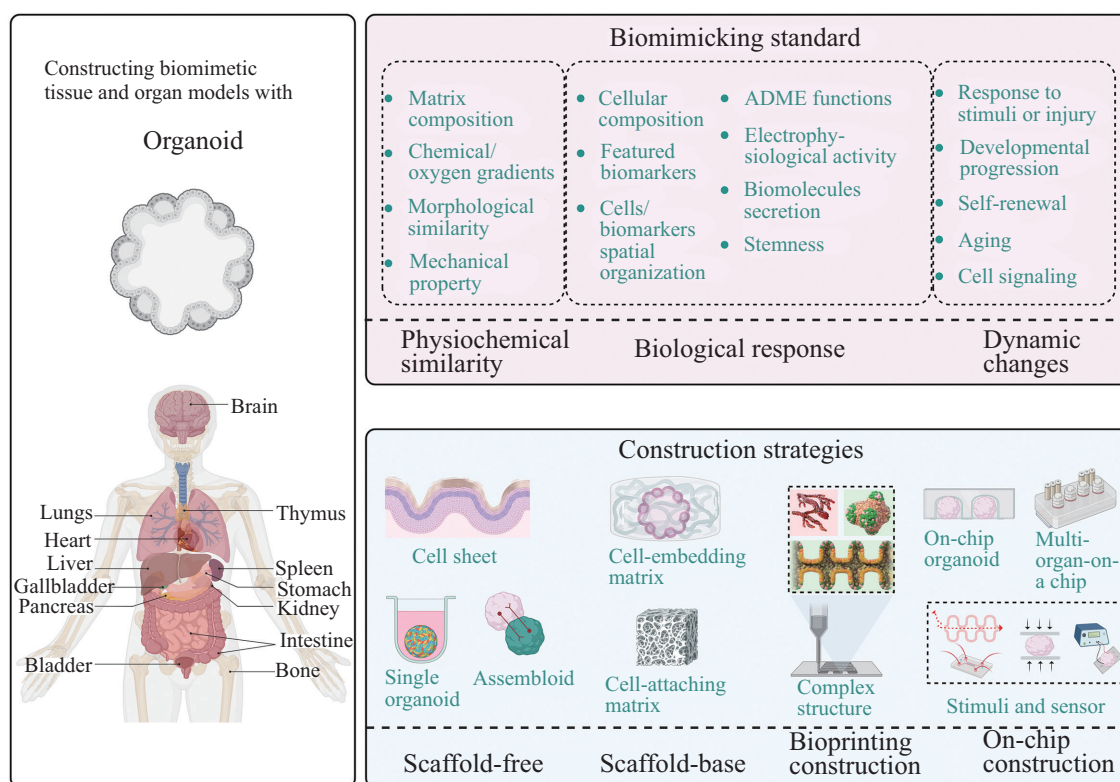


图1 构建基于类器官的仿生组织器官模型的标准和策略(构建于BioRender.com)

Fig.1 Standards and strategies for constructing organoid-based biomimetic tissue and organ models (created with BioRender.com)

基础,然而构建复杂类器官系统,例如实现类器官的血管化、模拟多器官微环境及其空间组织,以及重现诸如心肌收缩与扩张、肺呼吸模拟、血流灌注等天然组织功能,仍然依赖于多种工程学策略的整合,包括生物三维打印与器官芯片及类器官芯片技术。其中生物打印技术通过“逐层沉积”或“喷墨”等方式,将含有细胞、支架材料及生物活性成分的生物墨水精确打印至预定位置,逐步构建三维细胞结构^[39-40]。如将含iPSCs的海藻酸盐生物墨水生物打印成功能性三维迷你肝脏,其可表达肝细胞特有的标志物,具备蛋白质(如白蛋白、纤维蛋白原和凝血酶原)合成、胆汁酸合成,以及将碳水化合物转化为脂肪酸的能力^[41]。上述无支架或有支架的单个类器官也可作为活细胞生物墨水,如构建具有功能性近端肾小管节段的图案化肾组织片^[42],以及应用“牺牲打印功能性组织(sacrificial writing into functional tissue, SWIFT)”方法将数十万个iPSCs诱导的类器官组装,结合嵌入式打印引入可灌注的血管通道,构建可灌注和跳动的心脏组织^[43]。

(类)器官芯片技术可通过设计排列细胞或组织,构建精准的三维细胞微环境,并通过流体灌注系统(如血液或空气流动)模拟真实器官的生理状态。芯片可以直接运用于生成肿瘤细胞球阵列,并且成功运用于药物筛选^[44],这一方法同样可以扩展到其他类器官培养。多种类器官互作模型可以更真实地模拟多种生理与病理过程,如EDINGTON等^[45]构建了包含4种、7种及10种类器官的互作模型系统。该类系统具备内部循环结构,以增强器官间的分子交换,并允许通过独立编程调控流速,从而精确控制药物分布。在双氯芬酸药代动力学研究中,该模型表现出良好的运行稳定性和可维护性。器官芯片为施加可控的外部刺激与实现实时传感检测提供了理想平台。例如,通过结合流体剪切力与三维支架结构,该技术能够支持肠道类器官的长期培养与成熟^[19];通过施加超生理机械压力,可模拟并研究骨关节炎的发展机制^[46];同时,该系统还具备对类器官进行实时力学、物理及生化等多维度表征的能力,为深入理解类器官功能提供了重要工具^[47]。此外,芯片可与生物打印结合,如将含有肝细胞的海藻酸盐水凝胶打印到微流控腔室中,构建一个生理相关的药代动力学模型,该模型能够在连续灌流条件下运行,同时保持细胞活力和肝细胞特有的功能,包括白蛋白和

纤维蛋白原的生成^[48]。鉴于类器官芯片技术的复杂性,接下来我们将详细描述类器官芯片的构建要点,包括芯片制造技术、微流控技术以及检测技术。

2 (类)器官芯片的构建

2.1 芯片制造技术

类器官芯片源于20世纪90年代提出的微流控技术,参照微电子加工技术,将实验室的制样、分离、检测等功能集中在一块数平方厘米的芯片上。芯片制造涉及材料的选择、加工、封装、表面处理以及与其他装置的集成,具体的材料选择和加工方式^[49]往往因应用不同而有所调整。材料需具有生物相容性(活细胞接触)、电绝缘性(避免信号干扰)、光学透明性(实时观测)及表面可修饰性(影响功能)等特性。不同芯片材料的生物相容性、渗透性等比较已在其他报道中有所论述^[50]。根据应用场景不同,制造材料可分为无机材料和高分子材料。无机材料包括单晶硅与石英玻璃,硅具备良好的化学惰性和热稳定性,光刻和蚀刻方式可以高精度再现二维或三维图案,但硅易脆、热导率小、透光性差。石英玻璃弥补了单晶硅在电学和光学的不足,其透明性和亲水性利于检测及细胞培养,尤其对紫外光敏感的光敏玻璃可以采用紫外分光光度法结合热处理及氟化氢去除晶体,方便加工,但其微细加工耗时昂贵。

制备芯片的高分子材料包括光敏聚合物(如SU-8/AZ光刻胶、环氧丙烯酸酯等光固化树脂)、弹性体材料[如聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)]、热塑性塑料[如聚甲基丙烯酸甲酯(poly-methylmethacrylate, PMMA)、聚碳酸酯(polycarbonate, PC)和聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)]和生物材料(如水凝胶、纸基)。光刻胶可通过旋涂法涂布到单晶硅片,以光刻方式制备不同深宽比的微纳米精度图案。光固化树脂可通过3D打印进行快速芯片成型,成本低、耐腐蚀、硬度高。通过弹性体材料对母版芯片上的结构进行转印复制,从而快速制备微型器件或三维微纳结构的这一技术被称为“软光刻”^[51]。由于PDMS具有良好的透光性、介电性、惰性、生物相容性,以及低成本,被广泛用于芯片制作,但PDMS也存在一定的分子吸附和固有的疏水性。热塑性材料如PMMA、PC和PET制备成本低、可通过多种方式(如激光直写、微细铣削、注塑等)加工,有利于大规模芯片生

产,但同时精度有限,某些材料存在耐溶剂性较差与疲劳强度较低的问题,前者使其在化学环境中易被腐蚀或溶胀,后者则导致其在循环载荷下更易开裂。生物材料芯片如水凝胶芯片可构建仿细胞外基质微环境,同时减小介质灌注产生的剪应力,而纸基微流控^[52]成本低、亲水性好、绿色环保,被广泛应用于微型快速检测,尤其是在资源匮乏地区。

通常结合3D打印、PDMS倒模及PDMS软光刻,可进行精密加工和快速迭代,无机材料更适合高压和高温的加工,而热塑性或无机材料可用于大规模生产和商业化。尽管器官芯片或微流控芯片制备材料和方法众多,但是随着芯片制造技术的发展,各材料和方法的界限正在模糊,未来或将灵活结合各种材料和制备手段,以及开发更通用的材料和技术。

2.2 微流控技术

(类)器官芯片的功能实现依赖于材料-细胞-流体的协同设计,微流体驱动技术通过控制营养输送、化学梯度生成、机械剪切力施加及细胞空间分布,成为(类)器官芯片发展的关键技术之一。其系统复杂度从单腔室灌注到多器官串联(如血脑屏障模型或人体芯片平台)逐级提升。关键的技术突破体现在以下三方面:(1)通道设计;(2)流体驱动;(3)微环境控制。

以芯片通道设计控制流体流动已被证明极为有用,例如,在小长度尺度下,黏性力相对惯性力占主导地位,如果微流道的直径小于约1 mm,则流动将是层流,促进产生物理和化学梯度,这些梯度已被用于研究非侵入性细胞定向迁移^[53]、心脏组织成型^[54]、神经轴突生长^[55]等。流体剪切应力可通过改变流速或通道尺寸进行调控,该调控独立于体系的物理与化学梯度^[56],并且可以通过使用纳米多孔膜以及限制细胞通过的微加工柱来将细胞与流动路径分离^[57]。可通过流体力学计算模型来优化微通道几何形状,从而增强氧气和营养物质的输送,进而提高细胞存活率和改善其功能^[58]。

芯片的流体驱动依赖于不同的力,如主动泵驱动和重力驱动。主动泵包括传统的注射泵^[59]、气压泵、微阀驱动的执行器泵^[60]和蠕动泵^[61]。泵的选择取决于培养为一次性灌注还是再循环灌注,如传统注射泵通常支持一次性灌注,而蠕动泵支持再循环。再循环的优势在于能使信号分子内循环,允许多器官的化学通讯,但再循环缺乏营养物质的持续补充,

并会导致废物的积累,需定期换液。重力驱动系统依赖静水压来驱动灌注^[62],可实现无泵简易循环,如将条件培养基从一个芯片系统按顺序转移到另外一个系统,如从肝到肾,被称为功能性耦合,但其可能在检测不同芯片模块之间的串扰作用时缺乏效力。

此外,由于和二维细胞培养不同,常见的培养现象如气泡和液体蒸发都在微尺度下被加剧,需要理解与微环境控制相关的无量纲数(用来表征竞争物理现象),包括(1)雷诺数(Reynolds number, Re),表征惯性力/黏性力平衡,一般小于2 000以保持稳定的层流;(2)佩克莱数(Peclet number, Pe),表征对流传递/扩散传递,Pe>1时细胞处于对流质量传递区,有助于将剪切应力与自分泌信号解耦,而Pe<1时有助于研究自分泌或旁分泌影响,这对一些剪切敏感的细胞(如胚胎干细胞可承受剪切力<10⁻³ dyn/cm²^[63],原代神经元可承受剪切力<10⁻³ dyn/cm²^[64])尤其重要;(3)达姆科勒数(Damköhler number, Da),表征扩散时间尺度/反应时间尺度,评估物质扩散/反应速率匹配性,优化营养输送效率。这些无量纲数与剪切应力和可溶性因子信号等环境因素之间的联系也有报道^[65],表明其在指导芯片尺寸和操作参数中的重要性。

2.3 检测技术

类器官芯片通过集成功学、电学、声学等多种外部刺激模块以模拟生理环境,同时结合原位传感技术实现动态监测,避免传统终点检测遗漏瞬时响应。其核心监测理化参数主要包含三类。(1)代谢指标追踪,如通过电化学传感器或pH敏感膜进行溶解氧^[66]/pH值测量^[67],通过基于酶的生物传感器测量葡萄糖和乳酸等分析物^[68]。(2)屏障功能追踪,通过插入微电极,结合阻抗谱法和拟合算法或者欧姆定律,测试跨上皮电阻抗(transsepithelial electrical resistance, TEER)来表征屏障组织(如胃肠道、肾脏和血脑屏障)的完整性和通透性,如血脑屏障TEER值相对较高(1 500~8 000 Ω·cm²)以确保中枢神经系统内环境稳定^[69],而肾近端小管上皮细胞渗漏,TEER值相对较低(6~10 Ω·cm²)^[70]。(3)电生理活动追踪,如以微电极阵列(microelectrode arrays, MEAs)检测心脏、神经肌肉、骨骼肌和神经系统的电生理变化,并且可与TEER同时集成到芯片中^[71]。

尽管芯片可以捕获大量理化参数信息,但实时分析基因和蛋白相当困难,其中一种方法为从芯片中采集培养基样本分析循环细胞(如免疫细胞和肿

瘤细胞)的分子信息^[72],但该方法需要优化流体动力学以保留细胞完整性,以及可检测的样本量有限,目前在反应终点分析所有细胞依然是首选。除此之外,对类器官形貌和表型长期监测相当重要,由于大部分芯片材料由光学透明材料构成,并且可以设计在传统荧光或共聚焦显微镜的成像深度范围内,因此可以对芯片内类器官原位染色进行活性或特定生物标志物的表达评估,同时结合机器学习算法,可以进行辅助图像和数据分析,例如使用深度学习卷积神经网络来追踪肿瘤球体的侵袭性^[73]。

通过选择合适的芯片制造技术和材料,合理优化微流控腔室、流道尺寸和流速,集成符合类器官特性的检测电极,引入相应的类器官,我们可以有效制备基于类器官芯片的仿生组织器官体系。

3 类器官芯片仿生组织器官构建策略

3.1 单器官模型

单器官芯片模型作为类器官芯片的基础形式,其功能保真度取决于细胞来源、培养环境、功能参数与芯片设计的协同优化。代表性构建案例包括肝脏、心脏和一些屏障性组织如上皮和血脑屏障芯片。

肝脏芯片可作为药物代谢研究平台,其合成代谢功能(白蛋白分泌水平及CYP450酶活性)应与不同培养时期的复苏人原代肝细胞对比,因冷冻保存的人原代肝细胞目前是药物代谢研究中的金标准^[74]。类器官肝芯片应在短期(3~7天)表现出合成和代谢功能以及一定程度的胆汁排泄^[75]。同时需要考虑加入非实质肝细胞[如肝窦内皮细胞、库普弗细胞(Kupffer cells)和肝星状细胞(hepatic stellate cells)]以增加胆汁分泌和维持代谢功能^[76],并且库普弗细胞和星状细胞有助于模拟非酒精性脂肪性肝病和肝癌^[77]。类器官肝芯片需模拟肝脏的血液灌注与代谢过程,通过提供动态流体环境、供应必需的氧气与营养物质,并及时清除代谢废物,支持其生理功能与解毒能力的体外模拟。同时,该芯片系统还应具备对代谢物浓度进行实时检测的能力。

心脏芯片应能够有效促进心肌细胞的成熟,并支持其与内皮细胞、成纤维细胞等的协同耦合,从而实现强健而同步的收缩功能与电信号转导。该模型还应展现出关键的电生理成熟标志,包括正向的力-频率关系(positive force-frequency relationship)以

及快速、协调的钙瞬变信号。应通过一系列关键检测指标(包括搏动频率、收缩力、兴奋阈值、最大捕获率和传导速度)进行功能评估,如可通过PDMS柱或悬臂梁的偏转在芯片中检测收缩力。为具备高度的电生理与机械功能成熟度,心脏组织需要表现出成体样基因表达谱、超微结构(有序排列的肌节、高密度的线粒体以及横小管网络)以及氧化代谢功能。通过在芯片中施加电刺激,可以促进源自iPSC的人类心肌细胞的成熟^[78]以及构建工程化心脏组织的心房与心室^[79]。

上皮组织构建了多种组织的屏障,在类器官芯片中通常采用多腔室设计,以多孔膜或水凝胶分隔不同的流体通道,来自相应器官的上皮细胞被接种在多孔膜的一侧以模拟上皮层,在气道和皮肤芯片中,上皮在气液界面(air-liquid interface)下培养以模拟体内条件^[80]。多种方式可以表征上皮屏障功能,如紧密连接标志物(tight junction markers),包括claudin和occludin^[81],以及跨上皮屏障的TEER值。目前上皮组织的体内TEER参考值尚未得到很好的表征但已获得其体外TEER值,如在一项全层皮肤芯片研究中,将包皮来源人真皮成纤维细胞与纤维蛋白构建的真皮基混合,种植到PET多孔膜上,全层人皮肤工程的培养包括真皮层的培养、真皮与表皮细胞(人永生化N/TERT-1角质形成细胞)的浸没培养以及后续更换于气液界面培养,在芯片中辅以灌流,以Ag/AgCl电极插入芯片接收端口,检测出动态灌流情况下全层皮肤的TEER值为 $(6.2 \pm 0.3) \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$,约是静态条件的2倍^[82]。为了模拟肺、肠道及角膜等器官在生理过程中所经历的机械微环境(如呼吸和蠕动引起的周期性拉伸,或眨眼产生的剪切应力),类器官芯片在设计时通常需要集成能够施加可控外部机械刺激(如周期性拉伸与剪切应力)的系统,而这些力学刺激已被验证能改善响应组织的上皮成熟度。此外,在构建上皮组织芯片时还需要考虑其他功能特性,例如,需在上呼吸道上皮模型中构建具有定向摆动功能的纤毛结构,以模拟人体气道通过纤毛协同运动将黏液包裹的异物颗粒定向清除的防御机制。与上皮组织屏障类似,血脑屏障芯片需要构建多种腔室来再现屏障功能,通常由薄膜或者水凝胶分隔血管腔室和脑腔室,脑区室由周细胞和星形胶质细胞构成^[83],芯片应被设计成具有适当范围的TEER值($1\ 500 \sim 8\ 000 \ \Omega \cdot \text{cm}^2$),以便在功能性药物研究或疾病建模中具有生理学价值。

3.2 多器官互作模型

尽管单类器官模型在模拟特定器官的结构和功能方面取得一定进展,但仍无法重现人体器官的复杂性和系统性相互作用,尤其在药物毒性预测方面存在明显局限,这直接导致药物临床研究的高失败率。多器官互作模型通过微循环系统将多个类器官连接成“器官-器官”动态交互网络,可实现类器官间的代谢、信号分子、药物或细胞等的交换,模拟体内关键器官互作机制,相比于单种组织器官模型

能更全面地模拟机体复杂生理环境下的功能动态变化及其系统性互作。目前,多器官互作模型已被成功应用于疾病建模、肿瘤研究、药物开发与评估等领域,为这些研究提供了高度仿生的体外平台。

目前多器官模型主要包括二联类器官模型和三联及以上类器官模型(表1)。其中,二联类器官模型可以在微流控芯片上串联培养2个不同的类器官,较为常见的组合为脑-肝、肠-肝、肝-胰、肝-肾等。例如,LIN等^[84]通过建立肝-肾串联类器官模型,采用

表1 多器官芯片互作模型
Table 1 Multi-organ-on-chip models

模型类型 Model type	模型组成 Model composition	细胞种类 Cell source	培养时间 Culture time	培养参数 Parameter	模型功能 Function	参考文献 References
Dual-organ model	Liver-kidney	HepaRG (hepatoma-derived cell line), HHStEC (human hepatic stellate cell), human fetal hepatocytes	14 d	0.8 Hz; 9 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; 100 μm height	Drug toxicity assessment	[84]
Dual-organ model	Skin-liver	HHStEC, HepaRG	5 d	0.5 Hz; (2.7 $\pm$ 0.2) $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	Pharmacokinetic analysis and efficacy assessment	[88-90]
Dual-organ model	Gingiva-skin	RHS-LC (reconstructed human skin containing MUTZ-3-derived Langerhans cells), RHG (reconstructed human gingiva)	72 h	500 mbar; 0.5 Hz	Drug toxicity assessment	[91]
Dual-organ model	Liver-pancreas	iPSC	30 d	100 $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$	Study of T2DM pathogenesis	[85]
Dual-organ model	Liver-brain	HLCs (hepatocyte-like cells), MSCs (mesenchymal stem cells), cortical neurospheres, BMECs (brain microvascular endothelial cells)-like cells	7 d	700 mbar; 1 Hz	Pharmacokinetic analysis	[92]
Dual-organ model	kidney-liver	MSCs, liver biopsies, kidney biopsies	10 d	500 mbar, 0.5 Hz	Pharmacokinetic analysis and efficacy assessment	[93]
Dual-organ model	Skin-hair follicle	Keratinocytes, dermal fibroblasts, dermal papilla cells	10 d	2.5 Hz	Establishment of skin models and investigating skin immunotoxicity	[94]
Dual-organ model	Liver-thyroid	HepaRG	21 d	300 mbar; 0.45 Hz; 100 μm height	Toxicity assessment	[95]
Multi-organ model (≥ 3)	Small intestine, Liver, neural spheroids, and kidney	iPSC	14 d	450 mbar; 0.5 Hz; (16.9 $\pm$ 0.7) $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	Establishment of an interaction model	[87]
Multi-organ model (≥ 3)	Heart, liver, bone, and skin	MSC, primary monocytes, keratinocytes, human umbilical vein endothelial cells	28 d	1.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	Pharmacokinetic analysis and efficacy assessment	[86]
Multi-organ model (≥ 3)	Skin-liver-thyroid	HHStEC, HepaRG, human thyrocytes	4 d	350 mbar; 0.5 Hz	Drug toxicity assessment	[96]

环孢素 A(cyclosporin A, CsA)单药及联合利福平的重复给药方案,验证了该平台在临床前药物开发中用于重复剂量多药联合毒性筛选的转化应用潜力。由于2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是一种系统性多器官代谢性疾病, YU等^[85]发现在循环灌注条件下对iPSC衍生的肝脏和胰岛类器官可进行长达30天的共培养,共培养的肝脏和胰岛类器官表现出良好的生长和改善的组织特异性功能,并在高糖条件下均表现出线粒体功能障碍和葡萄糖转运能力降低,证明其为与人肝胰岛轴高相关性的类器官芯片模型。

三联及以上类器官模型有助于模拟更复杂的多器官相互作用,目前已有组合包括共培养心脏、肝脏、骨骼、皮肤类器官,共培养小肠、肝脏、神经球和肾脏类器官等。例如, RONALDSON-BOUCHARD等^[86]通过血液循环串联培养心脏、肝脏、骨骼、皮肤4个类器官,不仅保持了各个类器官的表型,还研究了常见的抗癌药阿霉素对串联芯片中的类器官以及血管的影响。结果显示药物对串联共培养类器官的影响与临床研究结果非常相似,证明了多器官串联共培养能够成功地模拟人体中的药代动力学和药效学特征。RAMME等^[87]通过微流控装置,设计了一个由iPSCs诱导的肠道、肝脏、大脑和肾脏四联类器官模型,进而评估化合物ADME功能。这表明多器官互作模型能实现不同类器官的协同培养,具备精准模拟人体组织微环境的潜力。这一极具前景的仿生平台技术有望为人类疾病机制研究和创新药物研发带来突破性进展。

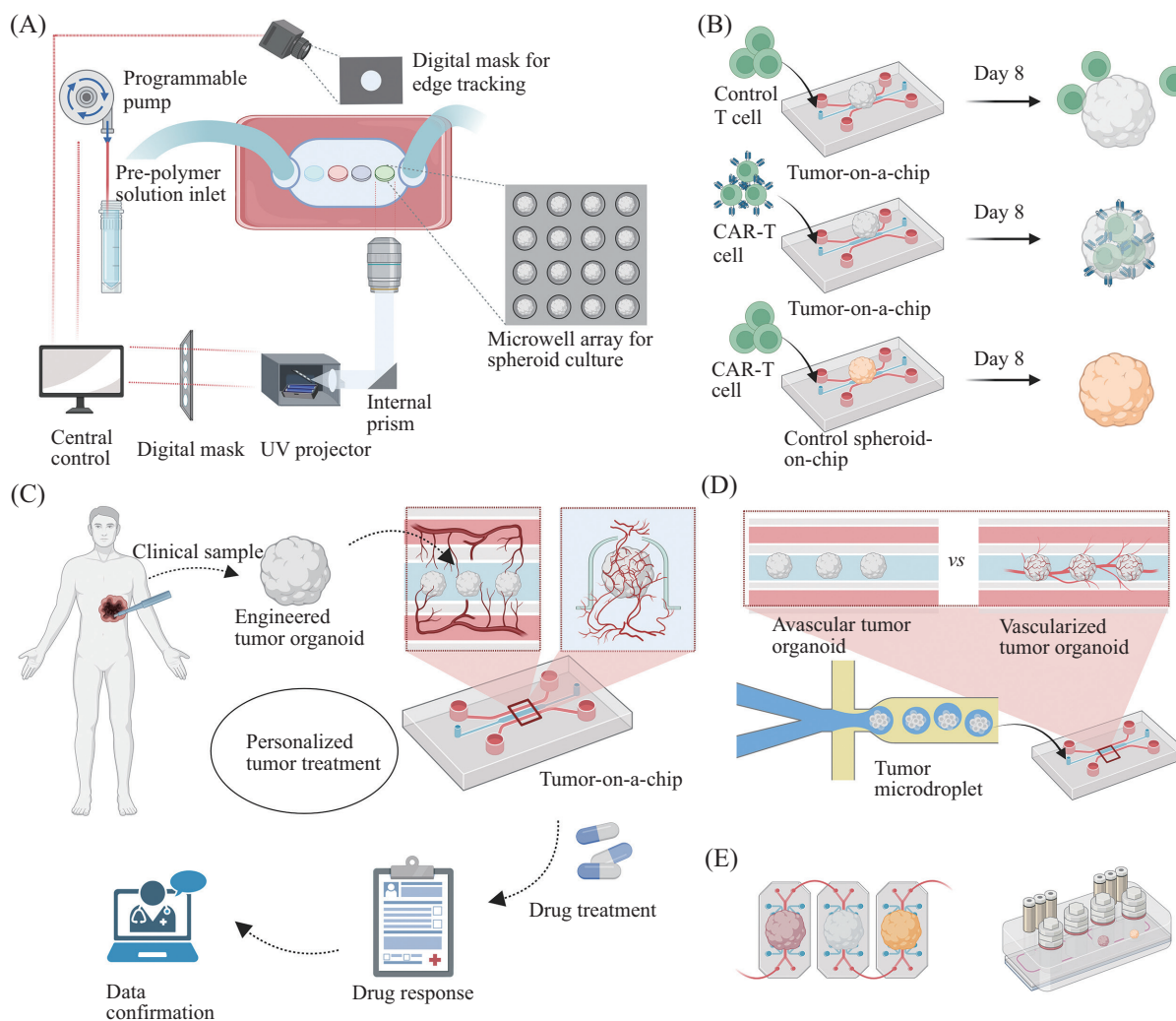
3.3 肿瘤模型

不同于其他组织,肿瘤微环境复杂,包括致密的ECM、不规则的血管、低氧环境以及有限的营养灌注,肿瘤本身表现出无限增殖、免疫逃逸、高度异质性等特性,肿瘤细胞本身、其他非癌细胞(如基质细胞)、免疫细胞、内皮细胞以及这些细胞周围的ECM都会随着肿瘤进展到不同阶段而发生变化和演化^[97-98]。肿瘤芯片平台则能够引入许多影响肿瘤发展的物理和生化因素,再现TME的许多基本特征,如机械剪切力、血管化环境、生化氧梯度以及生态位因子,有助于构建更贴合肿瘤微环境的仿生模型。

患者来源的肿瘤类器官(patient-derived tumor organoids, PDTOs)是取自患者体内原发性肿瘤,在体外培养出的微型3D肿瘤细胞模型,可以高度保留

来源肿瘤组织的特性。但当前的肿瘤类器官技术仍存在局限性,如临床组织样本量有限,类器官培养的效率低、均一性不够以及构建的模型复杂性不足^[99]。应用微孔技术培养可以有效提高类器官的均一性^[100],本团队开发出一种图像引导的原位无掩模光刻技术(图2A)^[101],该技术通过一个集成系统控制动态图案投影,由基于图像的边缘跟踪技术支持,并负责预聚物溶液的冲洗和停止,通过这种技术快速、低成本开发了自动化图案及大规模微孔阵列用于类器官培养。肿瘤免疫治疗如嵌合抗原受体CAR-T细胞治疗对一些实体瘤如乳腺癌依然非常困难,主要原因为相关靶标的异质性以及肿瘤微环境中的肿瘤血管、基质屏障等,在一项乳腺癌芯片模型研究中^[102],研究者通过整合内皮屏障,实现免疫细胞灌注且迁移浸润进肿瘤,实验进一步观测到长达八天的细胞因子动态释放谱,并证实该模型具有调控免疫反应的能力。该研究展示了类器官芯片技术在推动CAR-T细胞治疗产品开发方面的潜力,并为多种免疫治疗策略的体外测试提供了高效、可靠的平台(图2B)。

由于个体肿瘤差异巨大,个性化肿瘤治疗显得尤为重要,利用类器官芯片进行个性化肿瘤治疗简单步骤(图2C)如下。(1)获取患者来源的肿瘤临床样本(通过手术切除、穿刺活检、恶性积液等)。(2)将临床样本直接培养或提取肿瘤细胞后在体外培养成类器官。(3)构建复杂类器官芯片如血管化类器官以更好重现肿瘤微环境^[104]。(4)抗肿瘤药物在芯片中的敏感性测试。(5)根据测试结果辅助临床用药。如最近一项研究开发了血管化患者来源肿瘤类器官芯片,该模型将人脐静脉内皮细胞包埋于纤维蛋白基质中构建分层的肿瘤特异性微血管结构^[105]。研究发现,高度转移性肿瘤细胞通过Notch通路诱导血管生成并同时向血管迁移,同时其血管生成和迁移能力与其临床转移结果之间的明显关联,凸显了肿瘤类器官芯片在评估肿瘤转移方面的潜力,从而为临床决策提供宝贵见解。在构建血管化肿瘤芯片方面,本课题组以微流控制备载肿瘤细胞的单分散微凝胶(图2D),并将其导入芯片中成功制备了大小均一的血管化肿瘤类器官^[103],结果显示与血管相关的TME显著增强了药物筛选实验中的药物抗性。此外,肿瘤类器官芯片还可设计为多器官联动芯片(图2E),如肿瘤-皮肤芯片,可用于评估抗肿瘤药物的皮



A: 图像引导的快速成型技术用于类器官微阵列制造; B: 类器官芯片用于肿瘤类器官及CAR-T细胞共培养; C: 以肿瘤类器官芯片实现个性化肿瘤治疗的方案示意图; D: 血管化肿瘤类器官芯片制备; E: 肿瘤与多个器官联动芯片(左: 外接串联芯片; 右: 内部串联芯片)。

A: rapid prototyping technology for the fabrication of organoid microarrays; B: co-culture of tumor organoid and CAR-T cells on chips; C: schematic of personalized tumor treatment using tumor organ-on-a-chip devices; D: preparation of vascularized tumor organ-on-a-chip devices; E: tumor-tissue/organ communication via multi-organ on chips devices (left: external connected chip, right: internal connected chip).

图2 肿瘤类器官芯片的构建策略(根据参考文献[101-103]修改)

Fig.2 Strategies for constructing tumor organ-on-a-chip devices (modified from the references [101-103])

肤毒性。将传感器与芯片整合,可分析肿瘤微环境的时空信息、构建新兴实时传感和监测平台,可以开启快速、全面的肿瘤分析^[106]。需要注意的是,目前对肿瘤类器官芯片的研究大部分旨在模拟肿瘤一小部分功能,而非整个器官,未来或将整合正常人体器官及相应比例的肿瘤类器官芯片复合体。

4 挑战与展望

4.1 仿生度不足

尽管类器官芯片技术能模拟多种器官和组织的基本功能,但其仍存在仿生度不足的问题,具体原因如下。(1) 整合应用流体、气液界面或机械刺激

等特征进入芯片的技术挑战性^[107]。(2) 微型生物传感器整合芯片的设计与类器官培养的设计冲突,需要对培养装置进行调整。(3) 屏障类芯片在跨屏障物质运输模拟上仍不完善。(4) 一些类器官如脑类器官培养方案停留在胎儿阶段,降低芯片功能完善性。(5) 对复杂神经网络系统的模拟和调控以及高分辨MEA检测尚较为困难。

4.2 标准化与质控挑战

目前类器官芯片的设计、制造和操作程序的标准化和质控尚且不足,具体原因如下。(1) 类器官芯片目前主要集中在学术实验室的开发阶段,新颖性高,生产通量低。(2) 芯片验证需要大量可靠的生物

数据, 需要用户付出时间和资源成本, 此外从芯片系统获取数据仍然过度依赖终点分析, 生物信息的时空分辨率有限。(3) 芯片制造技术尚难以在规模化生产与高精度加工之间实现理想的平衡, 被商业或学术终端用户普遍接受需要时间。(4) 流体驱动需要多组注射泵或压力泵, 阀门、管道繁多, 操作较为复杂。

未来的发展或应侧重开发用户友好的模块化平台, 进行快速迭代优化兼顾规模生产, 如注塑成型等方法可以大规模制造芯片, 增材制造技术则能够实现新芯片结构的快速原型制备。小型、集成、自动化的器官芯片系统结合孔板化芯片将有力推动稳定、可靠且即用型的类器官培养平台的建立。此外, 重力灌注有助于降低手动连接泵的挑战性, 但双向剪切可能对细胞有变异性^[108]。值得注意的是, 培养基灌注、通道设计经常被认为是影响细胞反应的重要因素, 但是同时可能引起实验假象, 如施加于肠芯片上皮细胞的流体剪切应力曾被认为是驱动细胞分化和3D拓扑结构形成的原因; 然而后来Wnt拮抗剂DKK1的连续稀释被报道是造成流动条件下绒毛形成更显著的原因。在没有流动的情况下, 只需拥有一个更大的基底隔室来减轻DKK1对绒毛形态发生的抑制作用, 即可实现相同的效果^[109], 因此需使用具有明确作用机制或相关反应的范式化合物进行验证研究。未来或将提高芯片设计、材料选择、细胞培养条件等方面的一致性, 以提高实验数据的可比性和重复性。标准化将降低生产成本, 推动类器官芯片的普及应用, 有助于在全球范围内进行大规模药物筛选和数据共享, 促进药物筛选、疾病研究和个性化治疗。

4.3 AI驱动芯片设计

随着机器学习和AI技术的快速发展, 类器官及类器官芯片的大量数据可被加速整合, 数据驱动方法将显著推动类器官芯片在设计迭代与性能优化方面的发展。AI通过分析大量实验数据, 可自动识别与药物反应、细胞生长、代谢等相关的模式和规律, 从而灵活调整芯片设计以满足不同的实验需求^[110]。通过调整细胞类型、基质成分、微流控通道设计、灌流动态模拟等参数, 结合AI以预测芯片及实验设计对类器官培养及药物筛选的效果、预测药物间的相互作用和毒性, 为个性化医疗、临床试验和精准治疗提供重要支持。如PÉREZ-ALIACAR等^[111]采

用深度卷积神经网络, 对从微流控装置中获取的细胞显微图像进行训练分析, 成功识别出胶质母细胞瘤细胞在坏死过程中的关键形态特征, 从而帮助预测胶质母细胞瘤的演变。除了进行实验数据分析整合外, 构建数字化类器官也在研究中, 如将类器官进行3D分割, 定位细胞核、勾勒细胞边界以及勾勒类器官外部轮廓, 结合原始图像可构建3D分割信息的数字模型, 渗透应激、微环境拓扑测试精准反映了类器官响应, 验证了该数字化模型的仿真性^[112]。随着更多数字化类器官研究发展, 数字化类器官芯片也将用来模拟芯片中类器官的物理化学变化甚至于功能变化。

4.4 临床转化

类器官芯片技术的临床转化是未来发展的关键, 目前类器官芯片主要应用于学术研究和药物筛选, 但其广泛应用于临床实践仍存在障碍。具体原因如下。(1) 原代组织取样的方法及部位问题, 如穿刺活检等方法通常仅能获取微量组织样本, 尤其对于肿瘤转移灶, 严重限制了类器官的体外培养存活率。此外, 鉴于转移性肿瘤与原发肿瘤之间存在基因组异质性, 为准确模拟转移灶的生物学特性, 需获取转移部位的特定组织样本进行类器官培养。(2) 原代类器官传代多次后异质性或特征消失问题。(3) 样本培养成类器官成功率有限问题, 如肿瘤类器官中上皮细胞增殖速度高于肿瘤, 可能会被排挤污染^[113]。(4) 类器官建立及芯片构建缺乏标准化流程和质量控制, 需要证明其在药物研发和毒理学评估中的有效性和可重复性。(5) 用芯片类器官进行药物筛选时, 其培养周期与结果报道所需的时间应与临床治疗的时间框架密切匹配, 保证患者不会错过最佳治疗窗口。(6) 类器官芯片样本库尚未建立, 导致药物筛选的预期时间框架存在不确定性等。为推动类器官芯片临床转化, 减少诸如以上障碍, 需推动FDA等机构认证类器官芯片技术作为临床前药物筛选和毒理学评估的金标准。类器官芯片需要通过标准化验证程序, 以证明其在药物研发和毒理学评估中的有效性和可重复性。此外, 在推动技术应用时, 还需解决伦理问题, 特别是涉及个性化治疗、基因编辑和临床试验。

本综述总结概括了仿生组织器官的构建方案, 详细阐述了类器官芯片的构建原理及仿生策略, 强调了目前的挑战与改进方案。在未来, 随着类器官

及器官芯片的技术成熟化、标准化,类器官芯片将持续推动药物筛选、新药开发、精准医疗和再生医学等领域的发展。

参考文献 (References)

- [1] GOLDING H, KHURANA S, ZAITSEVA M. What is the predictive value of animal models for vaccine efficacy in humans? The importance of bridging studies and species-independent correlates of protection [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018, 10(4): 12.
- [2] MARTIN L, HUTCHENS M, HAWKINS C, et al. How much do clinical trials cost [J]? Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(6): 381-2.
- [3] BROOKS I R, GARRONE C M, KERINS C, et al. Functional genomics and the future of iPSCs in disease modeling [J]. Stem Cell Rep, 2022, 17(5): 1033-47.
- [4] LANGHANS S A. Three-dimensional *in vitro* cell culture models in drug discovery and drug repositioning [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 14.
- [5] RAUNER G, GUPTA P B, KUPERWASSER C. From 2D to 3D and beyond: the evolution and impact of *in vitro* tumor models in cancer research [J]. Nat Methods, 2025, doi: 10.1038/s41592-025-02769-1.
- [6] CORRO C, NOVELLASDEMUNT L, LI V S W. A brief history of organoids [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2020, 319(1): C151-C65.
- [7] WILSON H V. A new method by which sponges may be artificially reared [J]. Science, 1907, 25(649): 3.
- [8] SATO T, VRIES R G, SNIPPERT H J, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche [J]. Nature, 2009, 459(7244): 262-5.
- [9] LEUNG C M, DE HAAN P, RONALDSON-BOUCHARD K, et al. A guide to the organ-on-a-chip [J]. Nat Rev Methods Primers, 2022, 2(33): 28.
- [10] RUMSEY J W, LORANCE C, JACKSON M, et al. Classical complement pathway inhibition in a “human-on-a-chip” model of autoimmune demyelinating neuropathies [J]. Adv Ther, 2022, 5(6): 13.
- [11] ANDERSSON-ROLF A, GROOT K, KORVING J, et al. Long-term *in vitro* expansion of a human fetal pancreas stem cell that generates all three pancreatic cell lineages [J]. Cell, 2024, 187(26): 7394-413, e22.
- [12] FATEHULLAH A, TAN S H, BARKER N. Organoids as an *in vitro* model of human development and disease [J]. Nat Cell Biol, 2016, 18(3): 246-54.
- [13] CLEVERS H. Modeling development and disease with organoids [J]. Cell, 2016, 165(7): 1586-97.
- [14] LANCASTER M A, RENNER M, MARTIN C A, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly [J]. Nature, 2013, 501(7467): 373-9.
- [15] KIETZMANN T. Metabolic zonation of the liver: the oxygen gradient revisited [J]. Redox Biol, 2017, 11: 622-30.
- [16] ZACHOS N C, KOVBASNJUK O, FOULKE-ABEL J, et al. Human enteroids/colonoids and intestinal organoids functionally recapitulate normal intestinal physiology and pathophysiology [J]. J Biol Chem, 2016, 291(8): 7.
- [17] SPENCE J R, MAYHEW C N, RANKIN S A, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro* [J]. Nature, 2011, 470(7332): 105-9.
- [18] KOVBASNJUK O, ZACHOS N C, IN J, et al. Human enteroids: preclinical models of non-inflammatory diarrhea [J]. Stem Cell Res Ther, 2013, 4(1): S3.
- [19] NIKOLAEV M, MITROFANOVA O, BROGUIERE N, et al. Homeostatic mini-intestines through scaffold-guided organoid morphogenesis [J]. Nature, 2020, 585(7826): 574-8.
- [20] MITROFANOVA O, NIKOLAEV M, XU Q, et al. Bioengineered human colon organoids with *in vivo*-like cellular complexity and function [J]. Cell Stem Cell, 2024, 31(8): 1175-86, e7.
- [21] HU D, GAO C, LI J, et al. The preparation methods and types of cell sheets engineering [J]. Stem Cell Res Ther, 2024, 15(1): 22.
- [22] SAKAGUCHI K, SHIMIZU T, HORAGUCHI S, et al. *In vitro* engineering of vascularized tissue surrogates [J]. Sci Rep, 2013, 3: 7.
- [23] OVSIANIKOV A, KHADEMHOSEINI A, MIRONOV V. The synergy of scaffold-based and scaffold-free tissue engineering strategies [J]. Trends Biotechnol, 2018, 36(4): 348-57.
- [24] KIM H, KIM B, KIM S J, et al. Reconfigurable hanging drop microarray platform for on-demand preparation and analysis of spheroid array [J]. Adv Healthc Mater, 2024, 13(22): 2400501.
- [25] SAMAL P, MAURER P, VAN BLITTERSWIJK C, et al. A new microengineered platform for 4D tracking of single cells in a stem-cell-based *in vitro* morphogenesis model [J]. Adv Mater, 2020, 32(24): e1907966.
- [26] AMARAL A J R, PASPARAKIS G. Cell membrane engineering with synthetic materials: applications in cell spheroids, cellular glues and microtissue formation [J]. Acta Biomater, 2019, 90: 21-36.
- [27] SANDER J D, JOUNG J K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes [J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(4): 347-55.
- [28] ANDERSEN J, REVAH O, MIURA Y, et al. Generation of functional human 3D cortico-motor assembloids [J]. Cell, 2020, 183(7): 1913-29, e26.
- [29] WANG J, QIAO H, WANG Z, et al. Rational design and acoustic assembly of human cerebral cortex-like microtissues from hipsc-derived neural progenitors and neurons [J]. Adv Mater, 2023, 35(32): 2210631.
- [30] YAMAMOTO Y, GOTOH S, KOROGI Y, et al. Long-term expansion of alveolar stem cells derived from human iPS cells in organoids [J]. Nat Methods, 2017, 14(11): 1097-106.
- [31] FRENZ-WIESSNER S, FAIRLEY S D, BUSER M, et al. Generation of complex bone marrow organoids from human induced pluripotent stem cells [J]. Nat Methods, 2024, 21(5): 868-81.
- [32] WIMMER R A, LEOPOLDI A, AICHINGER M, et al. Human blood vessel organoids as a model of diabetic vasculopathy [J]. Nature, 2019, 565(7740): 505-10.
- [33] KOZŁOWSKI M T, CROOK C J, KU H T. Towards organoid culture without Matrigel [J]. Commun Biol, 2021, 4(1): 1387.
- [34] KIM S, MIN S, CHOI Y S, et al. Tissue extracellular matrix hydrogels as alternatives to Matrigel for culturing gastrointestinal organoids [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 1692.
- [35] PALIKUQI B, NGUYEN D T, LI G, et al. Adaptable haemodynamic endothelial cells for organogenesis and tumorigenesis [J].

- Nature, 2020, 585(7825): 426-32.
- [36] GJOEVSKI N, LUTOLF M P. Synthesis and characterization of well-defined hydrogel matrices and their application to intestinal stem cell and organoid culture [J]. *Nat Protoc*, 2017, 12(11): 2263-74.
- [37] WAN Z, BAI X, WANG X, et al. Mgp high-expressing mscs orchestrate the osteoimmune microenvironment of collagen/nano-hydroxyapatite-mediated bone regeneration [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(23): e2308986.
- [38] BAI L, ZHOU D, LI G, et al. Engineering bone/cartilage organoids: strategy, progress, and application [J]. *Bone Res*, 2024, 12(1): 66.
- [39] KESSEL B, LEE M, BONATO A, et al. 3D bioprinting of macroporous materials based on entangled hydrogel microstrands [J]. *Adv Sci*, 2020, 7(18): 2001419.
- [40] OU Y, CAO S, ZHANG Y, et al. Bioprinting microporous functional living materials from protein-based core-shell microgels [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 322.
- [41] FAULKNER-JONES A, FYFE C, CORNELISSEN D J, et al. Bioprinting of human pluripotent stem cells and their directed differentiation into hepatocyte-like cells for the generation of mini-livers in 3D [J]. *Biofabrication*, 2015, 7(4): 044102.
- [42] LAWLOR K T, VANSLAMBROUCK J M, HIGGINS J W, et al. Cellular extrusion bioprinting improves kidney organoid reproducibility and conformation [J]. *Nat Mater*, 2021, 20(2): 260-71.
- [43] SKYLAR-SCOTT M A, UZEL S G M, NAM L L, et al. Biomanufacturing of organ-specific tissues with high cellular density and embedded vascular channels [J]. *Sci Adv*, 2019, 5(9): eaaw2459.
- [44] PRINCE E, KHEIRI S, WANG Y, et al. Microfluidic arrays of breast tumor spheroids for drug screening and personalized cancer therapies [J]. *Adv Healthc Mater*, 2022, 11(1): 2101085.
- [45] EDINGTON C D, CHEN W L K, GEISHECKER E, et al. Interconnected microphysiological systems for quantitative biology and pharmacology studies [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4530.
- [46] OCCHETTA P, MAINARDI A, VOTTA E, et al. Hyperphysiological compression of articular cartilage induces an osteoarthritic phenotype in a cartilage-on-a-chip model [J]. *Nat Biomed Eng*, 2019, 3(7): 545-57.
- [47] LIU S, KUMARI S, HE H, et al. Biosensors integrated 3D organoid/organ-on-a-chip system: a real-time biomechanical, biophysical, and biochemical monitoring and characterization [J]. *Biosens Bioelectron*, 2023, 231: 115285.
- [48] PATI F, GANTELIUS J, SVAHN H A. 3D bioprinting of tissue/organ models [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55(15): 4650-65.
- [49] REN K, ZHOU J, WU H. Materials for microfluidic chip fabrication [J]. *Acc Chem Res*, 2013, 46(11): 2396-406.
- [50] YANG Q, ZHANG H, GAO B, et al. Organ-on-a-chip: fabrication methods and biomedical applications [J]. *SCIENTIA SINICA Technologica*, 2020, 51(1): 1-22.
- [51] ZHOU Y, SHAO N, BESSA DE CASTRO R, et al. Evaluation of single-cell cytokine secretion and cell-cell interactions with a hierarchical loading microwell chip [J]. *Cell Rep*, 2020, 31(4): 107574.
- [52] LOU Y, SHI X, ZHOU S, et al. Smartphone-based paper microfluidic detection implementing a versatile quick response code conversion strategy [J]. *Sens Actuators B Chem*, 2024, 406: 135393.
- [53] SAMANDARI M, RAFIEE L, ALIPANAH F, et al. A simple, low cost and reusable microfluidic gradient strategy and its application in modeling cancer invasion [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 10310.
- [54] RADISIC M, DEEN W, LANGER R, et al. Mathematical model of oxygen distribution in engineered cardiac tissue with parallel channel array perfused with culture medium containing oxygen carriers [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288(3): H1278-H89.
- [55] XIAO R R, ZENG W J, LI Y T, et al. Simultaneous generation of gradients with gradually changed slope in a microfluidic device for quantifying axon response [J]. *Anal Chem*, 2013, 85(16): 7842-50.
- [56] ORTEGA QUESADA B A, CUCCIA J, COATES R, et al. A modular microfluidic platform to study how fluid shear stress alters estrogen receptor phenotype in ER⁺ breast cancer cells [J]. *Microsyst Nanoeng*, 2024, doi: 10.21203/rs.3.rs-3399118/v1.
- [57] ZHOU Y, WU Y, PAUL R, et al. Hierarchical vessel network-supported tumor model-on-a-chip constructed by induced spontaneous anastomosis [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023, 15(5): 6431-41.
- [58] CARRARO A, HSU W M, KULIG K M, et al. *In vitro* analysis of a hepatic device with intrinsic microvascular-based channels [J]. *Biomed Microdevices*, 2008, 10(6): 795-805.
- [59] PARK S B, SHIN J H. Fully 3D-printed, nonelectric, spring-powered syringe pump for operating microfluidic devices [J]. *Sens Actuators B Chem*, 2024, 405: 135289.
- [60] ONG L J Y, CHING T, CHONG L H, et al. Self-aligning Tetris-Like (TILE) modular microfluidic platform for mimicking multi-organ interactions [J]. *Lab Chip*, 2019, 19(13): 2178-91.
- [61] SCHNEIDER S, BUBECK M, ROGAL J, et al. Peristaltic on-chip pump for tunable media circulation and whole blood perfusion in PDMS-free organ-on-chip and Organ-Disc systems [J]. *Lab Chip*, 2021, 21(20): 3963-78.
- [62] ONG L J Y, CHONG L H, JIN L, et al. A pump-free microfluidic 3D perfusion platform for the efficient differentiation of human hepatocyte-like cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(10): 2360-70.
- [63] BLAGOVIC K, KIM L Y, VOLDMAN J. Microfluidic perfusion for regulating diffusible signaling in stem cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e22892.
- [64] BHATTACHARJEE N, FOLCH A. Large-scale microfluidic gradient arrays reveal axon guidance behaviors in hippocampal neurons [J]. *Microsyst Nanoeng*, 2017, 3: 17003.
- [65] YOUNG E W, BEEBE D J. Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments [J]. *Chem Soc Rev*, 2010, 39(3): 1036-48.
- [66] KAUFMAN D, WINKLER S, HEUER C, et al. Automated electrochemical oxygen sensing using a 3D-printed microfluidic lab-on-a-chip system [J]. *Lab Chip*, 2025, 25(6): 1404-15.
- [67] LU Y, FENG Q, ZHANG R, et al. An online pH detection system based on a microfluidic chip [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1106: 71-8.
- [68] MEI L, YANG Y, LI J, et al. A SiO₂ hybrid enzyme-based biosensor with enhanced electrochemical stability for accuracy detection of glucose [J]. *Int J Anal Chem*, 2023, 2023(1): 6620613.
- [69] WOLFF A, ANTIFOLK M, BRODIN B, et al. *In vitro* blood-

- brain barrier models: an overview of established models and new microfluidic approaches [J]. *J Pharm Sci*, 2015, 104(9): 2727-46.
- [70] DENKER B M, SABATH E. The biology of epithelial cell tight junctions in the kidney [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(4): 622-5.
- [71] MAOZ B M, HERLAND A, HENRY O Y F, et al. Organs-on-Chips with combined multi-electrode array and transepithelial electrical resistance measurement capabilities [J]. *Lab Chip*, 2017, 17(13): 2294-302.
- [72] MORSINK M A J, WILLEMEN N G A, LEIJTEN J, et al. Immune organs and immune cells on a chip: an overview of biomedical applications [J]. *Micromachines*, 2020, 11(9): 849.
- [73] CHEN Z, MA N, SUN X, et al. Automated evaluation of tumor spheroid behavior in 3D culture using deep learning-based recognition [J]. *Biomaterials*, 2021, 272: 120770.
- [74] BOON R, KUMAR M, TRICOT T, et al. Amino acid levels determine metabolism and CYP450 function of hepatocytes and hepatoma cell lines [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1393.
- [75] CHAO P, MAGUIRE T, NOVIK E, et al. Evaluation of a microfluidic based cell culture platform with primary human hepatocytes for the prediction of hepatic clearance in human [J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, 78(6): 625-32.
- [76] STROBEL S, KOSTADINOVA R, FIASCHETTI-EGLI K, et al. A 3D primary human cell-based *in vitro* model of non-alcoholic steatohepatitis for efficacy testing of clinical drug candidates [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 22765.
- [77] MÜLLER F A, STURLA S J. Human *in vitro* models of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Curr Opin Toxicol*, 2019, 16: 9-16.
- [78] RONALDSON-BOUCHARD K, MA S P, YEAGER K, et al. Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2018, 556(7700): 239-43.
- [79] ZHAO Y, RAFATIAN N, FERIC N T, et al. A platform for generation of chamber-specific cardiac tissues and disease modeling [J]. *Cell*, 2019, 176(4): 913-27.e18.
- [80] CAO X, COYLE J P, XIONG R, et al. Invited review: human air-liquid-interface organotypic airway tissue models derived from primary tracheobronchial epithelial cells-overview and perspectives [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2021, 57(2): 104-32.
- [81] GÓRCEKA A A O, JURA-PÓŁTORAK A, KOŹMA E A O, et al. Biochemical modulators of tight junctions (TJs): occludin, claudin-2 and zonulin as biomarkers of intestinal barrier leakage in the diagnosis and assessment of inflammatory bowel disease progression [J]. *Molecules*, 2024, 29(19): 4577.
- [82] SRIRAM G, ALBERTI M, DANCİK Y, et al. Full-thickness human skin-on-chip with enhanced epidermal morphogenesis and barrier function [J]. *Mater Today*, 2018, 21(4): 326-40.
- [83] BROWN J A, PENSABENE V, MARKOV D A, et al. Recreating blood-brain barrier physiology and structure on chip: a novel neurovascular microfluidic bioreactor [J]. *Biomicrofluidics*, 2015, 9(5): 054124.
- [84] LIN N, ZHOU X, GENG X, et al. Repeated dose multi-drug testing using a microfluidic chip-based coculture of human liver and kidney proximal tubules equivalents [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 8879.
- [85] TAO T, DENG P, WANG Y, et al. Microengineered multi-organoid system from hiPSCs to recapitulate human liver-islet axis in normal and type 2 diabetes [J]. *Adv Sci*, 2022, 9(5): 2103495.
- [86] RONALDSON-BOUCHARD K, TELES D, YEAGER K, et al. A multi-organ chip with matured tissue niches linked by vascular flow [J]. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6(4): 351-71.
- [87] RAMME A P, LEOPOLD K, TOBIAS H, et al. Autologous induced pluripotent stem cell-derived four-organ-chip [J]. *Future Sci OA*, 2019, 5(8): FSO413.
- [88] TAO T P, BRANDMAIR K, GERLACH S, et al. Application of a skin and liver Chip2 microphysiological model to investigate the route-dependent toxicokinetics and toxicodynamics of consumer-relevant doses of genistein [J]. *J Appl Toxicol*, 2024, 44(2): 287-300.
- [89] TAO T P, BRANDMAIR K, GERLACH S, et al. Demonstration of the first-pass metabolism in the skin of the hair dye, 4-amino-2-hydroxytoluene, using the Chip2 skin-liver microphysiological model [J]. *J Appl Toxicol*, 2021, 41(10): 1553-67.
- [90] KÜHNEL J, TAO T P, BRANDMAIR K, et al. Characterization of application scenario-dependent pharmacokinetics and pharmacodynamic properties of permethrin and hyperforin in a dynamic skin and liver multi-organ-chip model [J]. *Toxicology*, 2021, 448: 152637.
- [91] KONING J J, RODRIGUES NEVES C T, SCHIMEK K, et al. A multi-organ-on-chip approach to investigate how oral exposure to metals can cause systemic toxicity leading to langerhans cell activation in skin [J]. *Front Toxicol*, 2021, 3: 824825.
- [92] KOENIG L, RAMME A P, FAUST D, et al. A human stem cell-derived brain-liver chip for assessing blood-brain-barrier permeation of pharmaceutical drugs [J]. *Cells*, 2022, 11(20): 3295.
- [93] NGUYEN V V T, YE S, GKOUZIOTI V, et al. A human kidney and liver organoid-based multi-organ-on-a-chip model to study the therapeutic effects and biodistribution of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles [J]. *J Extracell Vesicles*, 2022, 11(11): 12280.
- [94] VAHAV I, THON M, VAN DEN BROEK L J, et al. Proof-of-concept organ-on-chip study: topical cinnamaldehyde exposure of reconstructed human skin with integrated neopapillae cultured under dynamic flow [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(8): 1529.
- [95] KÜHNLENZ J, KARWELAT D, STEGER-HARTMANN T, et al. A microfluidic thyroid-liver platform to assess chemical safety in humans [J]. *Altex*, 2023, 40(1): 61-82.
- [96] TAO T P, MASCHMEYER I, LECLUYSE E L, et al. Development of a microphysiological skin-liver-thyroid Chip3 model and its application to evaluate the effects on thyroid hormones of topically applied cosmetic ingredients under consumer-relevant conditions [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1076254.
- [97] FETAH K L, DIPARDO B J, KONGADZEM E M, et al. Cancer modeling-on-a-chip with future artificial intelligence integration [J]. *Small*, 2019, 15(50): e1901985.
- [98] MALEY C C, AKTIPIS A, GRAHAM T A, et al. Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(10): 605-19.
- [99] DAVID TUVESON H C. Cancer modeling meets human organoid technology [J]. *Science*, 2019, 364: 3.
- [100] BAPTISTA D, TAHMASEBI BIRGANI Z, WIDOWSKI H, et al. Polymer film-based microwell array platform for long-term culture and research of human bronchial organoids [J]. *Mater Today Bio*, 2023, 19: 100603.
- [101] PAUL R, ZHAO Y, COSTER D, et al. Rapid prototyping of high-

- resolution large format microfluidic device through maskless image guided *in-situ* photopolymerization [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 4520.
- [102] MAULANA T I, TEUFEL C, CIPRIANO M, et al. Breast cancer-on-chip for patient-specific efficacy and safety testing of CAR-T cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2024, 31(7): 989-1002.e9.
- [103] WU Y, ZHAO Y, ZHOU Y, et al. Microfluidic droplet-assisted fabrication of vessel-supported tumors for preclinical drug discovery [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023, 15(12): 15152-61.
- [104] QUINTARD C, TUBBS E, JONSSON G, et al. A microfluidic platform integrating functional vascularized organoids-on-chip [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 1452.
- [105] DU Y, WANG Y R, BAO Q Y, et al. Personalized vascularized tumor organoid-on-a-chip for tumor metastasis and therapeutic targeting assessment [J]. *Adv Mater*, 2025, 37(6): 2412815.
- [106] ZHOU L, LIU L, CHANG M A, et al. Spatiotemporal dissection of tumor microenvironment via *in situ* sensing and monitoring in tumor-on-a-chip [J]. *Biosens Bioelectron*, 2023, 225: 115064.
- [107] PARK S E, GEORGESCU A, HUH D. Organoids-on-a-chip [J]. *Science*, 2019, 364(6444): 960-5.
- [108] JOHNSON B P, VITEK R A, MORGAN M M, et al. A micro-physiological approach to evaluate effectors of intercellular hedgehog signaling in development [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 621442.
- [109] SHIN W, HINOJOSA C D, INGBER D E, et al. Human intestinal morphogenesis controlled by transepithelial morphogen gradient and flow-dependent physical cues in a microengineered gut-on-a-chip [J]. *iScience*, 2019, 15: 391-406.
- [110] BAI L, WU Y, LI G, et al. AI-enabled organoids: construction, analysis, and application [J]. *Bioact Mater*, 2024, 31: 525-48.
- [111] PÉREZ-ALIACAR M, DOWEIDAR M H, DOBLARÉ M, et al. Predicting cell behaviour parameters from glioblastoma on a chip images. A deep learning approach [J]. *Comput Biol Med*, 2021, 135: 104547.
- [112] ONG H T, KARATAS E, POQUILLON T, et al. Digitalized organoids: integrated pipeline for high-speed 3D analysis of organoid structures using multilevel segmentation and cellular topology [J]. *Nat Methods*, 2025, 22(6): 1343-54.
- [113] XU H, LYU X, YI M, et al. Organoid technology and applications in cancer research [J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 116.