器官芯片的制备及生物医学工程应用

杨清振^{1,2}, 吕雪蒙^{1,2}, 刘妍^{1,2}, 张辉^{1,2}, 冀垣^{1,2}, 高彬^{3*}

1. 西安交通大学生命科学与技术学院, 生物医学信息工程教育部重点实验室, 西安 710049;

2. 西安交通大学仿生工程与生物力学中心, 西安 710049;

3. 空军军医大学第二附属医院内分泌科, 西安 710038

* E-mail: bingao0726@163.com

收稿日期: 2019-10-31; 接受日期: 2019-12-25; 网络版发表日期: 2020-05-11

国家自然科学基金(批准号: 51605377, 5191101479)和中国博士后科学基金(批准号: 2019M653593)资助项目

摘要 器官芯片是在体外构建疾病(或正常)模型的一种新兴技术, 近几年受到科研工作者和医务人员的广泛关注. 相比构建模型的传统方法, 具有便携性、高通量、可模拟在体微环境等优势, 在研究疾病的发病机理、筛选药物等方面有着广阔的应用前景. 本文介绍了器官芯片的发展历程, 综述了器官芯片的主要结构及材料, 通过分析现有器官芯片的结构, 认为高度集成的器官芯片包括微流控芯片、细胞/微组织、构建微环境的执行部件以及微传感器4个要素, 针对每个要素介绍了其常用制备方法. 随后讨论了器官芯片目前已取得的进展以及走向、临床应用所面临的挑战, 最后展望了器官芯片未来的发展方向.

关键词 器官芯片, 微流控芯片, 疾病模型, 体外培养, 药物筛选

1 引言

随着生活节奏的加快以及环境污染的日趋严重, 人类的健康也受到多种疾病的威胁, 如心脑血管疾病、癌症等, 人类健康问题已成为生物医学领域乃至各学科研究的热点^[1]. 人类疾病的产生通常非常复杂, 而以人类本身作为实验对象研究疾病的发生机制, 存在很多局限性, 在伦理上也受到严格限制. 因此, 构建相应的疾病(或正常)模型具有重要的意义. 理想的模型可用于模拟人体的生理状态, 也可用于研究疾病的发病机理, 进而探索有效的干预措施或进行药物筛选.

人们首先选用动物来构建人体疾病模型, 通过动

物实验来间接研究人类疾病发病机理, 从而寻找预防和治疗措施. 动物实验最早起源于古希腊, 公元前400年, 第一本医学手册《希波克拉底文集》中就有使用动物进行医学研究的例子(图1). 公元2世纪, 古罗马的医学家盖伦也是通过解剖动物, 认识了各个器官的功能. 到了近代, 很多生物学家仍采用动物实验进行科学研究, 如英国医生哈维、法国生物学家巴斯德等. 我国的中医在动物实验方面也有悠久的历史. 公元8世纪初, 唐代本草学家陈藏器写的《本草拾遗》中就有动物实验的记载, 该实验被认为是世界上最早的动物药理实验. 宋代寇宗奭的《本草衍义》, 记录了他在公元1116年做的动物实验, 采用胡雁作为实验对象,

引用格式: 杨清振, 吕雪蒙, 刘妍, 等. 器官芯片的制备及生物医学工程应用. 中国科学: 技术科学, 2021, 51: 1–22

Yang Q Z, Lü X M, Liu Y, et al. Organ-on-a-chip: Fabrication methods and biomedical applications (in Chinese). Sci Sin Tech, 2020, 2021, 51: 1–22, doi: 10.1360/SST-2019-0384

图1 (网络版彩图)器官芯片技术的发展历程。微流控芯片的图片引自参考文献[2], 器官芯片图片引自参考文献[3], 其余图片来自网络

Figure 1 (Color online) The development of organ-on-a-chip technology. Picture of microfluidic chip is from ref. [2], picture of organ-on-a-chip is from ref. [3], and other pictures are from the Internet.

研究了铜对骨折的治疗效果, 随后又把成功的试验结果应用到骨折病人的治疗中。动物实验在近代医学中占有重要的地位, 大量医学发现都与动物实验相关。目前, 动物实验仍然是生物医学领域广泛采用的研究技术。据估计目前在全世界用于实验的动物有上千种之多, 每年有超过1亿只动物被用于各类医学实验。

构建疾病(或正常)模型的另一种方式是进行细胞体外培养^[4]。最早的动物细胞体外培养是在公元1907年, 美国生物学家哈里森从蝌蚪的脊索中分离出神经组织, 并放在青蛙凝固的淋巴液中, 在体外培养了几周时间。通过改变细胞生存的微环境, 如培养基种类、血清类型、用量以及pH等, 目前多种类型的动物细胞都在体外成功实现了培养, 如哺乳类动物细胞甚至人体细胞, 细胞种类可以是胚胎细胞或成体细胞, 也可以是正常细胞或肿瘤细胞。通常来说, 细胞体外培养需要从动物(或人)体内取出活体组织, 经分离提纯后在体外进行孵育培养。由于培养过程是在人工条件下进行的, 所以细胞所处的环境可以调控, 如pH、温度、氧气浓度、二氧化碳浓度等, 便于研究不同条件对细胞行为的影响。另外, 随着显微镜技术的发展,

细胞体外培养的观察和检测也较为方便。目前细胞的体外培养技术已经广泛应用于细胞学、肿瘤学、分子生物学等多个领域。

动物实验和细胞体外培养技术被广泛用于模拟人体的生理功能, 但两种方法都有其内在的不足之处。动物实验的主要问题在于动物与人的种属不同, 动物与人类在生理结构、组织器官功能、生命维持等方面上仍存在差异, 动物实验的结果尚不能完全用来预测相同环境对人类的影响。而且, 动物实验研究存在模型建立周期长、成本高、效率低、研究时间点单一等局限性。另外, 动物实验还涉及伦理道德问题。近些年, 世界各地纷纷成立了爱护动物协会(Society for the Prevention of Cruelty to Animals, SPCA), 该协会强烈反对将动物用于实验。所以动物实验面临着越来越大的道德和舆论压力。

至于传统的细胞体外培养, 通常是将细胞培养在培养皿中, 控制培养条件, 随后观察细胞的生长、分化等行为。采用培养皿进行细胞培养操作简单, 因此被广泛使用, 但该方法的主要缺点在于无法提供细胞生长、分化所需的整体微环境, 导致细胞和在体情况下的形态和功能具有较大的差异。在体环境下, 细胞通常会承受一些力、电等物理刺激, 如人体呼吸过程中, 肺泡会承受周期性的拉应力, 神经细胞则会受到电刺激, 而体外培养难以施加这些物理刺激。另外, 体外培养的细胞在形态和结构上与在体也有较大差异。大多数细胞在体内会形成三维结构, 而培养皿培养的细胞缺乏由细胞基质构成的立体支架, 导致细胞只能贴壁生长形成二维结构, 丧失了其在体内生长时的立体形态。上述这些因素导致传统方法培养的细胞与体内的情况相差甚远。以药物筛选为例, 通常三维模型中细胞比二维培养的细胞具有更强的抗药性, 因此通过传统细胞体外培养方法构建疾病模型, 筛选出的药物超过90%不能通过临床药物试验^[5]。

所以, 目前亟需一种新的技术方法, 在体外实现人体生理或病理模型的构建。若能成功实现, 将在药物筛选等诸多领域得到广泛应用。在此背景下器官芯片应运而生, 并在近几年取得了迅猛发展^[6]。为了使广大科研工作者更好地了解器官芯片这一新兴技术, 本文综述了器官芯片的主要进展, 包括其工作原理、制作工艺以及在生物医学工程中的应用, 最后是器官芯片的发展方向 and 面临的挑战。

2 器官芯片的发展历程

一种新技术的出现往往依赖其他领域或学科的知识,即多学科交叉.例如生物医学工程是采用工程技术手段解决医学问题,它基于多学科的理论和方法,为生物医学问题提供解决方案,从而为人类的健康保驾护航.20世纪80年代出现了微纳加工技术,该技术渗透到多个领域并得到了广泛的应用.到了90年代,科研工作者开始采用微纳加工技术制备微流控芯片,主要用于化学分析及生化反应^[2,7].近些年随着微流控技术的发展,人们开始将细胞的体外培养技术同微流控芯片相结合,形成了器官芯片(organ-on-a-chip),该技术为体外构建人体生理模型提供了新的思路.器官芯片作为近年出现的高新技术,在21世纪初即有了雏形,但标志性事件是2010年哈佛大学Ingber课题组^[3]在*Science*发表的论文,该文章作者采用微纳技术在体外构建了肺芯片,该芯片可模拟肺的“呼吸”过程,更接近人的在体环境.该研究工作让人们认识到了器官芯片的强大功能,及其在生物医学领域巨大的潜力.

器官芯片是伴随微纳技术的发展应运而生的,原因在于器官芯片上的微组织及流道一般在微米尺度.人体内器官的基本单元尺寸很小,如肺泡的平均直径约为200 μm .为模拟器官基本单元的功能,则应构建相应尺寸的体外组织^[8].另外,体外培养的细胞所需的营养主要依靠扩散作用,其极限扩散尺寸为100~200 μm ,器官芯片上的组织如果大于该尺寸,则难以实现长时间培养.芯片上的流道需要与培养的组织尺寸相匹配,即为微米级,所以器官芯片的制备强烈依赖于微纳加工技术.另外器官芯片与生物、材料、医学等学科也是息息相关的.

器官芯片在生物医学工程领域有着重要的应用前景,其中最受瞩目的是用于药物筛选^[9],主要流程如下:首先采用微纳技术在芯片上加工出特定的微结构或实现细胞的特定排布,从而模拟出疾病状态下的细胞微环境,促使其形成器官的基本单元.随后将待筛选药物通过微流道加入培养液中进而作用于微组织单元,通过监测其生理状态判断药物的药效,实现药物的筛选.器官芯片用于药物筛选的重要优势是高通量,采用微纳技术和3D生物打印等方法可实现微组织单元的高通量制备,而微流控系统可实现药物浓度、种类的梯度化进样,所以一个芯片可得到多个实验数据,

具有很强的统计意义.器官芯片的另一重要用途是进行人体的生理学研究,如可将多种细胞进行共培养,研究人体内多器官的相互作用,另外还可采用微纳技术在芯片上制造执行器,用来研究力、电等外界刺激对细胞的生长分化及功能的影响.利用器官芯片进行生理学研究及药物筛选的不同之处在于,需要构建正常生理状态的微组织模型.器官芯片可以认为是在微流控芯片上制备人类器官微缩模型.研究人员正在极力推崇这项襁褓中的技术,目前已经在芯片上实现了肺、肝脏、肾脏、肿瘤等器官和组织的制备.

近年来,器官芯片引起了人们的广泛关注,发展也极为迅速.美国前总统奥巴马在2011年声明由美国国立卫生研究院(NIH)、食品药品监督管理局(FDA)和国防部(DARPA)共同资助,开展器官芯片的相关研究,旨在开发一种新的药物筛选平台.另外世界各大制药公司也纷纷与高校和研究所开展合作,进行器官芯片的开发.荷兰生物技术公司Mimetas研发了一种肾脏芯片,并与几家制药公司达成了合作协议将其用于药物筛选.另外,强生公司与哈佛大学Wyss生物工程研究所所属的Emulate公司合作,采用人体血栓仿真芯片进行药物筛选,并计划采用肝脏芯片检测药物的肝毒性.据统计,2016年器官芯片产品及服务的销售额约为750万美元,其市场增长非常迅速.2017~2022年芯片器官的市场增长率预计为38%~57%,按此增长速度,2022年其市场规模为6000万~1.17亿美元.长期看来,器官芯片可能形成数十亿美元的市场.

3 器官芯片的原理及制备

3.1 器官芯片的原理

器官芯片的主要目的是在体外模拟人体器官的基本功能.人体的器官通常由一些功能单元组成,这些单元是人体器官运行的基本单位.如肺泡是肺部的最末一级分支,人体所需的氧气正是通过肺泡扩散到血液进而运转到全身.肺泡是气体交换的主要部位,也是肺的功能单位.其他器官也通常由一些基本单元组成,如肝脏的肝小叶、肾脏的肾小球等^[8].在体外构建人体器官的这些基本功能单元,进而模拟在体的细胞微环境是器官芯片的主要目标.

器官芯片的主要原理是采用微纳加工的方法在硅、有机玻璃等基底材料制成的微型芯片上加工出特

定形状的微结构阵列,并在该结构上种植细胞.通常芯片上会集成微流体通道等结构,为细胞提供氧气和营养物质、排出代谢产物.经过一段时间的培养,细胞会形成具有功能的组织单元,该芯片便称为器官芯片.器官芯片设计的目标是模仿器官的结构和功能,使它成为一个体外模拟平台,最终构建正常模型进行生理学研究,或者构建疾病模型进行药物筛选等^[10].另一和器官芯片容易混淆的概念是组织芯片(tissue chip),组织芯片是将数十至上千个小组织排列在载玻片(或其他材料)上而制成的组织切片.两者的主要区别在于,组织芯片通常是从生物体取样直接切片,随后对切片组织进行分析检测,一般不进行体外的培养.而器官芯片是将活细胞接种到芯片上,通常与微流控技术相结合,对细胞进行长时间的体外培养,同时施加与体内类似的物理化学刺激,从而得到与体内功能相近的组织器官,可以说器官芯片是对人体器官的一种模拟.

器官芯片可以认为是在芯片实验室(lab on a chip)基础上进行的组织体外培养.首先在芯片上构建细胞所需的刚度等物理微环境,采用微纳加工技术成形微结构用于细胞的生长和培养,同时施加相应的外界刺激从而获得所需的器官模型,随后通过微流体通道为微器官提供营养、氧气和生长因子等,可实现细胞的长时间培养(最长可达2~3周).通过微流道还可以将药物加到培养基中,随后观察细胞对药物的反应以实现药物筛选.所以器官芯片兼具有芯片实验室的优势和组织体外培养的特点,具体如下.

(1) 高通量.器官芯片采用微纳加工的方法在芯片上实现样品阵列的排布,通常一个芯片上可包含几千个甚至上万个样品,可同时得到多组检测数据,相比传统的方法省时省力.

(2) 便携性.器官芯片通常尺寸比较小,芯片上样品尺寸和流道都在微米级,而整个芯片一般为毫米或厘米级,所以携带方便.尺寸小带来的另一优势是节省材料、试剂,并且降低了功耗.

(3) 易于形成浓度梯度.通过设计器官芯片上的微流道可实现液体组分的不同配比,如“圣诞树”形微流道可实现浓度在不同流道的逐渐变化^[11],形成浓度梯度对筛选药物具有重要的作用.

(4) 模拟体内的物理环境.细胞所处的物理环境对细胞的生长分化有着重要的影响,如何在芯片上模拟

体内的物理环境是制备器官芯片的关键.目前微纳技术已经在芯片上实现了基质刚度的可控调节^[12~15],产生拉压应力、流体剪切应力对细胞进行力学刺激^[3,16~20],加工电极对细胞进行电刺激等^[21],这些技术手段可以更好地模拟体内细胞微环境.随着微纳加工技术的进步,器官芯片能够构建的微环境种类也越来越多.

(5) 结果易于数字化处理.器官芯片可将待检测信号转化为电信号或光信号,便于数字化采集及后续处理^[22].另外如果芯片为透明材质,微器官的形态学等检测可以拍照后通过图像处理的方式进行,方便快捷,并且一次处理可得到多个数据.

3.2 器官芯片的材料

器官芯片的材料是其加工制备和应用的基础,常用材料有聚二甲基硅氧烷(PDMS)、玻璃、硅、有机玻璃(聚甲基丙烯酸甲酯, PMMA)等.其中最常见的是PDMS材料,PDMS的组分包括预聚体和固化剂,将两者按照一定比例混合,在加热或常温的条件下即可固化形成具有一定弹性的固体.其主要优点是无毒,具有化学惰性,光学透明,使用简单而且成本低廉,因此被广泛应用于器官芯片的制备.另外通过改变预聚体和固化剂的比例,可以调控PDMS的刚度.PDMS材料的主要缺点是表面比较疏水,需经修饰才可让细胞黏附,通常会在其表面修饰一层生物兼容性较好的纤连蛋白或水凝胶材料,以促进细胞的贴壁生长^[23,24].另外一种方式是和其他材料结合来制备器官芯片,如在PDMS上加工出微流道结构并将其覆盖在玻璃片上,PDMS材料只提供流动所需的微流道结构,而细胞在玻璃表面上贴壁生长,从而规避了PDMS材料的生物兼容性问题.PDMS材料的另一缺陷是对小分子材料有较高的吸收率,如果采用PDMS材料的器官芯片进行药物筛选,则应考虑其吸收问题^[25].

玻璃和硅材料也被广泛用于器官芯片的制备,玻璃的主要成分是二氧化硅,和硅的加工方法相通.两种材料的主要优势是可采用标准的微纳加工工艺(如光刻、刻蚀等),加工成形精度高(可达纳米级),并且具有较好的生物兼容性.中国科学院大连化学物理研究所林炳承课题组^[26]制备了肝脏芯片,并用于药物筛选,该芯片的中间层采用的是玻璃材料,加工方法选用的湿法刻蚀.玻璃和硅材料的主要缺点是需要专业的加

工设备, 加工成本昂贵, 另外硅材料透光性差, 对芯片上细胞或微组织进行直接观察比较困难, 在一定程度上限制了其应用。

水凝胶由于其良好的生物兼容性, 近年来受到人们的广泛关注. 美国休斯顿大学的Akay课题组^[11]采用聚乙二醇双丙烯酸酯(PEGDA)制备了脑肿瘤芯片, 并将其用于抗肿瘤药物的筛选. 重庆大学侯长军小组^[27,28]采用PEGDA材料制备了多种器官芯片, 证明了该材料对多种细胞都具有较好的生物兼容性. PEGDA材料的优点是透明、低毒、可光固化且为亲水材料, 以上特征使得PEGDA适合制造器官芯片并进行细胞培养. 浙江大学贺永课题组^[29,30]采用甲基丙烯酰化明胶(GelMA)等水凝胶材料制备了多种器官芯片. 水凝胶材料的多孔特性、含水量及生物分子的扩散性均与天然细胞外基质(ECM)非常相似, 可用于模拟细胞在体内的生长环境。

纸基器官芯片是近几年发展的一种新型器官芯片^[31,32]. 用纸张作为基底代替硅、玻璃、高聚物等材料, 通过各种加工技术, 在纸上加工出具有一定结构的亲/疏水微细通道网络及相关分析器件. 与其他材料的器官芯片相比, 纸基芯片的优点包括成本更低, 纸张来源丰富, 且价格远低于硅、玻璃/石英甚至聚合物等材料^[33,34]; 另外, 纸的加工比较简单, 可通过光刻、蜡印、喷墨打印、绘图等方式制作二维纸芯片, 或通过简单的折纸或多层纸片叠加的方法制作三维纸芯片^[35]. 此外纸本身属于多孔材料, 具有很强的毛细作用, 经图案化疏水性处理后即能控制液体的定向流动, 而无需外置的驱动泵. 纸的尺寸比较薄(0.07~1 mm), 质地轻, 可折叠, 因此易于保存和运输. 另外纸基材料的生物兼容性好, 纸的主要成分为纤维素, 具有良好的

生物兼容性, 可在上面进行细胞或微组织的培养. 并且纸的后处理比较简单, 对环境没有污染^[36].

器官芯片的材料还可选择其他高分子聚合物, 如聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA, 俗称有机玻璃)、聚己内酯(PCL)以及聚氨酯(TPU). PMMA材料广泛用于芯片的制备, PMMA的优点是透光性好、成本低、成型容易, 另外该材料重量轻, 其密度只有普通玻璃的1/2. PMMA还具有良好的电绝缘性, 可施加高电场进行液体的驱动、分离等操作. PCL以及TPU的主要优点是透光性好, 另外熔点较低, 可用于3D打印. 器官芯片常用材料的特点如表1所示, 选取芯片材料应具体考虑材料的生物兼容性、渗透性、绝缘性、散热性以及制作工艺等。

3.3 器官芯片的制备方法

器官芯片依据功能和用途的不同, 其结构设计也有较大差异. 器官芯片并不仅是把细胞种植在芯片上, 更重要的在芯片上构建与体内相近的物理化学微环境, 使细胞在形态及功能上与在体情况一致. 通过综述现有文献, 我们认为功能较为完备的器官芯片应该包括4个要素: 微流控芯片本体、芯片上的细胞或微组织、用于施加物理化学刺激的微执行部件以及监测细胞生理生化状态的微传感器(如图2所示)^[37]. 在实际应用中, 有些器官芯片不一定具有上述所有的4个要素, 其中芯片本体和细胞(或微组织)是必备的. 近几年, 随着制造技术的进步, 执行部件和传感器开始被集成到器官芯片上, 执行部件的目的是为了促进细胞成熟和功能化, 传感器则是为了方便结果的检测和读取。

3.3.1 微流控芯片的制备

微流控芯片本体的结构通常包括微流道、营养液

表 1 器官芯片常用材料的性能对比

Table 1 Performance of commonly used materials for organ-on-a-chip

材料	亲水性	生物兼容性	通道渗透性	试剂存留	透光性	加工温度	成本
PDMS	疏水	好(表面处理)	高	高	好	低	低
玻璃	亲水	好	无	低	好	高	中
硅	可调	中	无	低	无	高	高
有机玻璃	可调	好	中	中等	好	中	中
聚对二甲苯	疏水	中	低	中	好	低	中
水凝胶	亲水	好	高	高	好	低	中
纸	亲水	好	高	高	低	低	低

图 2 (网络版彩图)器官芯片的4个关键要素: 微流控芯片、细胞/微组织、微传感器以及微执行器
Figure 2 (Color online) Four key elements of an organ-on-a-chip: microfluidic chip, cell/microtissue, microsensor, and microactuator.

的出口和入口等,主要作用是对细胞进行培养,为细胞提供营养、排出代谢产物.芯片的本体结构也不尽相同,有些芯片采用静置培养的方式,如Li等人^[38]制备的器官芯片没有采用微流道结构为芯片上微组织提供养分,而是将芯片直接浸入培养液中.器官芯片依据其结构、功能和材料的不同,也采用不同的制造工艺.目前对于微流控芯片本体,主流的加工方法包括光刻法、模塑法、微接触压印法、激光刻蚀法、机械加工以及3D打印等^[39,40],如表2所示.

光刻法是最经典也是应用最广泛的微纳加工技术,主要采用掩模板、光刻胶和紫外光(或其他光源)进行微纳结构的成形,其加工原理如图3(a)所示^[41].首先是制备掩模板,使得掩模板部分区域透光.随后在基底上涂覆一层光刻胶,将掩模板置于基底上方,并打开

光源进行照射.基底上光刻胶光照后发生光化学反应产生交联,经显影液显影后,掩模板上的图案即转移到光刻胶上.光刻后通常会进行一些后续的处理工艺,如刻蚀等,从而将微纳结构转移到基底上.光刻工艺的优点是工艺成熟,加工精度高,可达亚微米甚至纳米级.其缺点是加工材料种类有一定局限性,通常是硅或者玻璃材料;另外设备也比较昂贵,特别是制备掩模板的设备,所以一般科研单位多采用外协加工的方式.

为克服上述缺点,近年来出现了一种方法,可以采用简单的设备实现光刻.该方法在透明薄膜上打印图形化的阻光材料,该掩模通常被称作菲林,随后将菲林用于光敏材料的光刻(图3(b)).该方法所需的设备和操作都比较简单,通常不需要刻蚀等后续工艺,采用简易的紫外光源即可开展.其缺点是成形精度较低,只能成形几十微米以上的结构.其加工精度也可满足很多器官芯片的需求,目前该方法已用于水凝胶材料的芯片制备^[11].

制备微流控芯片的另一类方法是模塑法,也是最常采用的方法,其加工原理如图3(c)所示.模塑法中的阳模由其他方法(如光刻等)制备得到.随后将液态的高分子材料倾倒入阳模表面,在重力或其他外力(如机械压力、毛细力、电场力等)的驱动下,液态高分子材料填充至模具的微结构中,随后将液体材料固化并脱模即得所需的微纳结构^[12,42-45].模塑法的关键是降低阳模和高分子材料之间的黏附力,以便于脱模.由于模塑法的阳模可重复使用,所以该方法成本较低,适合批量化生产.模塑法中的阳模可选择硅、玻璃、SU-8胶或PDMS材料等,而高分子材料则可选择

表 2 微流控芯片的常见制备技术
Table 2 Fabrication techniques for microfluidic chips

制备技术	加工精度	加工材料	成本	批量化制备
经典光刻	高	硅、玻璃	高	高
菲林光刻	低	光交联水凝胶(如PEGDA)	低	高
机械加工	低	PMMA等	中	中
模塑法	高	易固化高分子材料(如PDMS)	低	高
微接触压印	高	PDMS、水凝胶等	低	高
激光刻蚀法	中	光解高分子材料	中	低
热压法	低	热塑性材料(如PMMA)	中	高
3D打印	低	环烯烃共聚物(COC)、聚氨酯(TPU)等	低	低

图 3 (网络版彩图) 微流控芯片常用的加工技术

Figure 3 (Color online) Common fabrication techniques for microfluidic chips.

PDMS、环氧树脂、聚氨脂等。模塑法制备微流控芯片最典型的方法是选用硅模具和PDMS材料的组合。硅模具通常由光刻法制备, 随后将PDMS预聚体和固化剂按一定比例混合均匀倒在硅模具上, 并置于真空环境以促进气泡的排出, 待PDMS固化后将其从硅模具上脱开。该方法成形精度高, 其复形精度可达几纳米, 是目前制备微流体芯片最常用的技术。模塑成形的另一种方法是将PMMA材料加热到塑性状态, 随后将阳模压到材料表面并施加机械压力, 冷却脱模即得PMMA微流控芯片。该方法通常也称为热压法, 可用于微流控芯片的批量化制备^[46]。

微接触印刷法采用弹性的模具蘸取液态墨水材料, 并将其转印到基底材料上。弹性模具多是PDMS材料, 采用模塑法制备得到。微接触印刷法通过选取不同的墨水材料, 可改变基材表面的物理化学性质(图3(d))。例如, 比利时蒙斯埃诺大学Sylvain Gabriele研究小组^[47,48]采用PDMS模具蘸取纤连蛋白到基底上, 制备了图形化的纤连蛋白图案。由于纤连蛋白易于细胞的贴壁和生长, 因此细胞会选择表面有纤连蛋白的区域生长, 该芯片可用于制备图形化的细胞图案。微接触印刷法的主要用途是基底的表面改性, 但不能用

于结构的成形制备。该方法采用的模具为弹性材料, 因此也可用于曲面基材的表面改性。

激光刻蚀法是制备微流控芯片的另一方法, 其原理是利用高能激光产生的高温使固体气化, 从而实现材料切除的效果, 通过控制激光的照射区域即得结构化的微流控芯片(图3(e))。激光刻蚀法主要用于加工PMMA材料, 也有研究人员采用该方法加工双面胶材料, 基本过程是将双面胶粘在玻璃或PMMA基底材料上, 随后用激光刻蚀在双面胶上加工出微流道结构, 并在双面胶上粘上盖板。该工艺过程中, 双面胶的作用一是将基底和盖板黏接在一起, 另外双面胶还充当了微流体芯片中的流道结构。最近, 飞秒激光刻蚀法还被用来加工玻璃等材料, 研究人员采用该方法甚至制备出了三维微流道^[49-51]。

近年来, 随着机械加工精度的不断提高, 很多加工工艺(如机械精雕技术)被用于微流控芯片的制备。精雕技术属于铣削加工的方法, 采用微细的铣刀对材料进行切除, 从而得到特定形状的微流控芯片(图3(f))。目前的精雕机床多采用自动编程技术, 可以将芯片的三维设计图直接转化为刀具的运动路径。精雕机床可实现准三维结构的加工, 如阶梯状的微流道、微反应腔等, 其加工精度最高可达数十微米。该技术的局限性是对材料的机械加工性能要求比较高, 常用的加工材料是有机玻璃, 而对于硅、玻璃等材料的加工则较难实现。

3.3.2 微流控芯片的集成与封装

上述的加工方法, 不管是光刻法、模塑法还是机械精雕, 加工出的结构都属于开口结构, 即结构的上表面与外界环境相通。为构建独立可控的系统环境, 防止漏液等现象, 通常要在开口结构上加一盖板, 进行封装。另外有些器官芯片结构比较复杂, 需要分成多个部分分别制造, 随后再键合封装在一起。常用的键合技术包括热键合、胶黏键合以及表面改性键合等。热键合的方法是将芯片加热到一定温度并施加外力, 使键合表面紧密接触, 形成分子间作用力从而产生键合。热键合适用批量化生产, 但其缺点是键合强度较低, 容易开裂。该方法适用于玻璃、PMMA等材料^[52]。胶黏键合是通过基底与盖片之间的黏接层实现键合的方法, 美国斯坦福大学Zare小组^[53]采用PDMS预聚体作为黏接剂实现了PDMS-PDMS的键合,

另外PDMS预聚体还被用于PDMS-玻璃之间以及PDMS-硅之间的键合^[54]。丙酮作为黏接剂可用于PMMA材料间的黏接^[39]。氢氟酸可用于玻璃之间的键合。胶黏接的方法操作简单, 成本较低, 不需要加热, 并且键合强度较高。表面改性键合采用紫外光、臭氧或等离子体对材料的表面进行处理, 使其表面的物理化学性质发生变化, 从而提高键合表面之间的亲和力。例如, PDMS表面经过等离子体处理后, 其表面疏水化的甲基会变成亲水性的硅羟基, 从而形成较强的分子间作用力, 可实现PDMS-PDMS的键合^[55]。表面改性键合也可用于PDMS以及PMMA等芯片的键合。

除了上述的“先分部制作, 再键合封装”的策略, 目前还有另一种一体化成型的方法——3D打印(图3(g))。近几年, 随着3D打印精度的提高和可打印材料种类的增加, 研究人员开始用3D打印制备微流控芯片^[56,57]。3D打印采用逐层打印的方式, 可成形复杂形状的三维结构, 在机械、教育、生物、医疗等行业有着广泛的应用^[58]。3D打印按照其原理可分为几种不同的类型, 目前用于微流控芯片制备的包括熔融沉积型3D打印、挤出式3D打印以及光固化3D打印。熔融沉积型3D打印的原理是利用高温将各种丝材(如工程塑料ABS、聚碳酸酯PC等)在喷头处融化成液态, 并将其从打印头挤出后固化, 涂覆在工作台上形成特定的图案。随后通过逐层打印, 即可在立体空间上形成三维微流控芯片^[59]。挤出式3D打印则是把材料在注射器中加热到融化或采用常温下为液态的聚合物材料, 通过气压或机械压力将材料从注射器中挤出。挤出式3D打印制备微流控芯片要求材料的熔点低、透明性好、生物兼容性好, 通常选择的材料包括PCL和TPU等^[3,60,61]。美国西雅图华盛顿大学Folch课题组^[62]采用光固化3D打印的方式, 制备了PEGDA材料的器官芯片。3D打印制备微流控芯片的主要优势是可以做到一体化成形, 而不需要后续的键合封装等步骤, 另外该方法可制备复杂结构的微流控芯片^[37,63,64]。目前面向微流控芯片的3D打印机已经实现了商业化, 如英国Dolomite公司生产的Fluidic Factory系列3D打印机, 该打印机属熔融沉积型, 采用生物毒性较小的环烯烃共聚物(COC)材料, 可用于微流控芯片的3D打印直接成形。3D打印由于操作方便、简单快速、可一体化成形的优势, 此外3D打印可降低手工芯片组装的差异性和提高效率, 因此在微流控芯片的制备方面有着广阔的前景^[65,66]。

3.3.3 细胞/微组织的制备

器官芯片与一般的微流控芯片相比, 需要在芯片上种植细胞(或微组织)并进行培养, 本文主要探讨器官芯片上微组织的制备方法、形态(如二维还是三维)、细胞种类、来源以及培养方式等几个方面。

首先细胞/微组织的制备有不同的方式, 主要分为定点滴加法和捕获收集法两种。定点滴加法采用移液枪等工具将细胞悬液或者细胞和水凝胶的混合物滴加到芯片的特定位置, 如图4(a)所示。东京医科齿科大学Yasuda课题组^[67]用移液枪将单个心肌细胞定点种植到每个微孔中, 并研究了细胞距离对心肌细胞间通信的影响。中国科学院大连化学物理研究所林炳承和秦建华课题组^[26]将包裹肝癌细胞的微组织直接注射到芯片的培养室中, 用于研究药物毒性。捕获收集法是制备器官芯片上微组织最常用的方法, 该方法采用重力、电场力、毛细力等外力或者采用几何结构约束等将细胞(或微组织)捕获收集到特定的区域并进行后续的培养, 如图4(b)~(d)所示。几何约束法广泛用于器官芯片的细胞收集, 如美国麻省理工学院Bhatia课题组^[68]在芯片上制备了U形微结构, 细胞在随液体流动过程中陷入U形结构中, 从而实现定位收集。重力沉降法也可用于细胞收集, 在重力的作用下, 细胞会沉降在微孔中, 经过一段时间的培养形成三维细胞球, 并可用于药物筛选。美国休斯顿大学的Akay等人同西安交通大

图4 (网络版彩图)细胞/微组织的制备方法。(a) 定点滴加法; (b) 几何约束收集法; (c) 基于重力的沉降收集法; (d) 基于介电泳的细胞收集法

Figure 4 (Color online) Cell/microtissue preparation methods. (a) Dripping method; (b) geometry constraint collection method; (c) gravity-based sedimentation collection method; (d) dielectrophoresis-based collection method.

学仿生工程与生物力学中心合作,在流道的侧壁制备出微孔小室,细胞在液体的流动冲击作用下进入小室进而形成微组织,而流道中残留的细胞则被冲走进入废液池.研究人员优化了小室的形状位置以达到最佳的收集效果,随后采用这种方法制备了三维脑肿瘤芯片并进行了药物的筛选^[11].电场力是捕获和收集细胞常用的一种手段,由于细胞和周围介质的电学参数(如介电常数、导电率等)不同,施加外电场后,细胞会承受一外力,通常称为介电泳力^[69,70].利用介电泳力可实现细胞的操控并收集到特定区域,甚至可实现不同细胞的分类、筛选等操作(不同细胞的介电常数、导电率等参数一般也不同).台湾清华大学刘承贤教授课题组^[71,72]采用介电泳的方法将肝细胞定向收集并排布成射线状,以模拟肝小叶的结构.此外激光光镊、磁力操作等收集方法也被用于器官芯片上细胞的收集^[73].

器官芯片上的细胞(或微组织)按照形态可分为二维和三维.二维组织的制备比较简单,将细胞悬液直接通入芯片中,则细胞沉降在微流道内并贴壁生长,形成二维平面结构.体内有些组织本身呈二维状态,如肺泡上皮细胞、血管上皮细胞等在体内倾向于铺展成二维,因此在体外制备二维结构完全能够模拟其功能.如Ingber课题构建的肺芯片,将肺泡上皮细胞培养在多孔PDMS薄膜上形成了二维平面组织,模拟了肺的呼吸过程.随着生物材料的发展和加工技术的进步,人们开始在器官芯片上培育三维微组织.以肿瘤芯片为例,科研工作者将癌细胞收集在微流控芯片小室中(microwell)使其成形为三维癌细胞球,或采用悬挂液滴法制备三维细胞球.体内器官单元多为三维形貌,在器官芯片上构建三维微组织,其功能上与在体情况更为接近,如韩国高丽大学Lee课题组^[74,75]通过研究证明相比二维平面癌细胞,三维癌细胞球在抗药性上更接近人体真实情况.器官芯片上构建三维微组织更常见的方式是采用水凝胶等材料作为细胞外基质,待其交联后形成三维多孔网络并将细胞固定在内部,从而形成三维微组织.如Bhatia课题组^[68]制备的肝脏芯片即是采用聚乙二醇水凝胶(PEG)包裹肝实质细胞,制备了三维肝脏微组织.

构建器官芯片微组织的另一因素是细胞来源,主要包括永生细胞系、原代细胞以及干细胞(或诱导多能干细胞).目前,永生细胞系是细胞体外培养最常用的,也是器官芯片中使用最广泛的细胞.其优点是形态

比较均一、生长增殖比较稳定,通常有市售可直接购买,但其缺点是与体内组织表型往往不匹配,细胞系具有遗传同质性而不具有特异性.原代细胞是从机体中取出后用于培养的细胞,其优点是具有个体差异性能够更好地反映个体生理状态,原代细胞的难点是细胞的提取^[76].加拿大蒙特利尔大学Gervais课题组^[77]直接从肿瘤患者病灶部位提取肿瘤组织并培养在器官芯片上,采用该芯片筛选的药物对病人具有更好的治疗效果.干细胞(诱导性多能干细胞)也是从机体中直接提取的,具有一定的分化能力,在合适的体外条件下可分化成特定的目标细胞^[78,79].干细胞分化的细胞携带的遗传信息与在体相同,采用干细胞构建器官芯片可反映个体的差异性.Bhatia课题组^[68]采用诱导性多能干细胞(iPS)分化了肝实质细胞,并包裹在PEG水凝胶中构建了肝脏芯片,该芯片上的体外肝脏微组织在培养28天后仍然具有功能性.

器官芯片上的微组织按照细胞种类可分为单一细胞培养和多细胞共培养,通常根据所研究的问题选择细胞种类.以肿瘤芯片为例,如果研究肿瘤细胞的侵袭,则需在芯片上共同培养肿瘤细胞和靶器官细胞以研究肿瘤细胞对靶器官的侵袭过程.而研究抗肿瘤药物对肿瘤的治疗效果,可在芯片上仅培养瘤细胞,随后加载药物观察瘤细胞的存活率.在体情况下抗肿瘤药物通常先经过肝脏解毒,然后到达病灶区域,所以科研工作者也尝试在肿瘤芯片上共同培养肝细胞和肿瘤细胞用于研究药物的实际疗效.采用多细胞共培养与在体的情况更为接近,但其操作也相对复杂.多细胞共培养器官芯片采用多孔薄膜(如PC膜、PDMS膜)将不同种类细胞隔离,如Ingber课题组^[3]制备的肺芯片将肺泡上皮细胞种植在PDMS薄膜一侧,随后将芯片倒置将血管内皮细胞种植在薄膜另一面.多孔膜的主要作用是物理隔离不同细胞,但细胞分泌物可透过薄膜从而实现细胞的交叉调控.

器官芯片上微组织在制备过程完成后,通常需要持续供应培养基以维持组织内细胞所需的养分.按照培养方式的不同,器官芯片可分为静态培养和动态培养两种.美国先进制药公司Li等人^[38]在芯片上加工了开口式“微井”结构并在内部种植肝实质细胞、肾皮质细胞等,随后将芯片整体浸入培养基中,依靠培养基的扩散作用实现营养的输送和代谢产物排出,该方式称之为静态培养.静态培养所需的芯片结构简单,操作

也比较方便, 在早期的器官芯片中被广泛采用. 其缺点是需要经常换液, 另外芯片上所有细胞与培养基都存在扩散现象, 易导致交叉污染. 动态培养依靠蠕动泵或其他外部设备为芯片持续提供培养基, 通常在芯片上加工出微流道及分支结构以实现营养供给、代谢产物排出, 并且不同区域微组织具有物理隔绝避免了交叉污染. 动态培养可控性较高并且易于实现自动化培养, 目前在器官芯片中的应用也越来越广泛.

3.3.4 物理化学微环境的构建

体外培养的细胞或微组织需要在特定的微环境下, 才能发育成熟并表现出功能性, 为此器官芯片也需要构建合适的物理化学微环境以实现细胞的功能. 化学微环境构建通常是指在培养基中加入特定的生长因子, 以促进细胞生长发育及成熟. 另外, 体内的细胞还承受着力、电等物理刺激, 在器官芯片上构建合适的物理微环境也是器官芯片的重要课题, 本文主要讨论器官芯片上基质刚度、形貌以及力、电、热刺激的构建.

首先, 基质的刚度和表面形貌对细胞的行为具有重要的调控作用. 美国波士顿大学Chen课题组^[14,80]采用光刻-刻蚀-翻模工艺制备了PDMS材料微柱阵列并用于心肌成纤维细胞的体外培养, 通过改变微柱的直径、高度等参数可调控基质的等效刚度. 美国加州大学洛杉矶分校Tseng和Di Carlo^[15]采用灰度光刻法制备刚度可调的水凝胶基质. 该方法采用呈灰度分布的光掩膜, 在紫外照射下交联光敏聚合物产生不同程度的交联. 哈佛大学Khademhosseini研究小组^[81]采用混合扩散法制备了刚度梯度的基质, 并用来研究内皮细胞的生长行为. 基质的表面形貌对细胞的朝向有着重要的影响, 如哈佛大学Lewis和Parker小组^[22]制备的心脏芯片通过在PDMS材料表面制备了微尺度的沟槽结构并培养心肌细胞, 细胞由于表面结构的调控沿沟槽结构生长. 调控心肌细胞朝向的目的是使其沿同一长轴方向收缩, 产生协同收缩力.

其次, 人体内的细胞往往受到不同程度的外力作用, 这些外力对细胞的功能化至关重要, 例如目前已有研究结果证明生理性肠蠕动产生的应力可以诱导人Caco-2结肠腺癌细胞形成稳定的肠绒毛^[16]. 西安交通大学仿生工程与生物力学中心在器官芯片的力学微环境构建方向也开展了相应的工作, 通过在水凝胶材料

中加入磁性颗粒, 施加外磁场可对样品进行力学刺激. 前期研究发现当拉伸应变到达某一临界值(~120%), 肌肉细胞出现早期凋亡甚至坏死. 当拉伸应变控制在一定范围时, 凝胶中的肌肉细胞排列会垂直于拉伸方向, 随着拉伸应变的继续增加, 细胞出现极化并逐渐平行于拉伸方向^[17]. 上海交通大学姜宗来团队^[82]制备了器官芯片, 在体外模拟血液的流体剪切力对平滑肌细胞的作用, 研究分析了细胞在正常剪切应力和低剪切应力条件下培养的蛋白质谱差异.

器官芯片的电学和热学微环境构建也引起人们广泛关注. 通过在芯片上制备导电材料, 并施加周期性电流可调控心肌细胞的跳动节律. 构建合适的电学微环境对细胞(特别是对电流敏感的心肌和神经等细胞)的体外培养具有重要的意义^[21]. 众所周知, 温度对细胞的行为也有重要影响. 重庆大学杨军课题组^[83]在透明导电玻璃上培养了成肌细胞, 通过在导电层施加电流产生焦耳热, 从而调控细胞所处区域的温度, 证明了温度对成肌细胞生长的影响. 目前, 器官芯片上的细胞多是在恒温环境中进行培养, 在器官芯片上构建温度微环境, 研究变温情况下细胞的行为可能是未来的发展方向.

3.3.5 器官芯片传感器的制备

如何读取器官芯片上的结果也是器官芯片制备和应用过程中需重点关注的问题. 早期的器官芯片通常采用试剂对细胞染色, 表征其死活及象征其功能的标志物或进行基因检测. 上述表征方法的缺点是对细胞具有破坏性, 另外难以做到实时监测. 近几年, 科研工作者开始在器官芯片上集成微传感器, 用于检测细胞的生理行为. 如上文提到的Lewis和Parker小组^[22]制备的心脏芯片上集成了PDMS薄片并在内部嵌入导电的炭黑材料, 心肌细胞的收缩跳动带动薄膜弯曲变形并引起炭黑导电性能变化, 通过表征导电率可以实时监测细胞的跳动频率及幅值. Chen小组^[13]采用PDMS翻模的方法在芯片上制备了微柱阵列, 芯片上心肌细胞的收缩会带动微柱弯曲变形, 通过观测微柱的变形量可推测细胞收缩力. 东南大学赵远锦课题组^[84]采用反蛋白石结构GelMa水凝胶薄膜制备了心脏芯片, 心肌细胞的收缩会导致该水凝胶材料的颜色变化, 可作为传感器表征细胞的跳动. Ingber^[85]在芯片上集成制备了金电极和铂电极, 可实时监测心肌细胞的膜电位和

跨膜电阻.

综上所述, 高度集成的器官芯片可包括4个要素, 微流控芯片、微组织、构建微环境的执行器以及微传感器. 通常这4个部分采用不同方法制备并封装成完整的器官芯片, 但近几年人们开始尝试用3D打印机一次成形制备器官芯片, 由于上述4个部分对材料的需求不同, 这就要求3D打印机可实现多材料(包括活细胞)多喷头的高精度打印. 目前尚无商业化的设备可实现完整器官芯片的3D打印成形, 国内外一些课题组自行搭建3D打印机用于器官芯片的一体化制备, 如清华大学的孙伟课题组^[86]、美国哈佛大学的Lewis课题组^[22]、韩国浦项工业大学的Cho课题组等^[60].

4 器官芯片的生物医学工程应用

前文综述了器官芯片的结构及其主要制备方法, 本文将在下面篇幅介绍器官芯片在生物医学工程中的应用. 对于体内的不同器官, 人们关注的焦点问题也不尽相同, 因此本文将针对人体几种典型的器官, 介绍相应器官芯片的研究进展及应用.

4.1 肝脏芯片

肝脏是人体内最大的器官, 在人体内扮演着多种重要角色(如储存糖原、分泌性蛋白质合成、新陈代谢等), 其中以代谢功能最为重要, 肝脏可以将体内和体外的物质经生物转化彻底分解或以原型排出体外. 因此, 在新药的研发过程中, 肝毒性的测定成为不可或缺的内容. 随着器官芯片的出现, 人们开始制备肝脏芯片, 其研究主要集中在体外肝结构的模拟、药物筛选及毒性检验等^[72].

肝脏的功能单元是呈六边形的肝小叶, 体外肝结构模拟的主要目标是将肝细胞排列成类似肝小叶的六边形图案. 德国图宾根大学Stelzle小组^[87]制备了肝脏芯片, 该芯片在管道中排列有微槽, 采用介电泳力将肝细胞固定在上面, 两侧流道用来灌注液体. 该芯片上的肝细胞排列成条状, 并且能够以稳定的功能状态存活7天. 在此基础上, 台湾清华大学刘承贤课题组^[71]利用同轴电极阵列将肝细胞与脐静脉内皮细胞(HU-VECs)排列在PDMS芯片上, 成功模拟出肝小叶六边形结构, 如图5(a)和(b)所示. 哈佛医学院Yarmush小组^[88]采用多孔聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)薄膜把芯片分

隔为上下两层, 将鼠原代肝细胞包裹在基质和纤连蛋白中并置于下层, 而上层持续灌注培养, 建立了“三明治”肝脏芯片.

近年来, 肝脏芯片在药物的肝毒性检测中得到广泛应用. 瑞士罗氏制药公司Roth小组^[89]通过建立人-鼠肝细胞3D共培养的器官芯片, 发现肝脏芯片在药物筛选和肝毒性检测方面的功能优于单一肝细胞的平面培养. 加州大学伯克利分校Lee课题组^[90]采用微纳加工的方法制备了肝血窦芯片, 该芯片可在体外模拟肝血窦结构并能长时间培养, 为药代动力学-药效动力学的研究提供了平台, 如图5(c)和(d). 相比传统的体外肝脏模型, 肝脏芯片不仅可以构建肝小叶的微观结构, 而且能够在很长一段时期内保持肝脏特异性功能, 从而建立更加接近人体的肝模型.

4.2 肾脏芯片

肾脏是人体最重要的排泄器官, 它通过尿液排出代谢废物和毒物. 肾脏中肾小管具有重要作用, 肾小管上皮细胞的主要功能是将小管液的水分及其他物质转运回血液. 在体情况下肾小管上皮细胞受到流体剪切力的作用, 为此Ingber课题组^[76]设计一种多层微流体肾脏芯片, 上层管道模拟肾小管液体的流动, 下层为静态液体, 两层管道用多孔薄膜隔开, 并将原位提

图5 (网络版彩图) 肝脏芯片. (a) 肝脏基本单元肝小叶结构示意图^[71]; (b) 在芯片上制备的肝小叶六边形结构^[71], 比例尺500 μm ; (c) 肝血窦芯片结构^[90], 比例尺50 μm ; (d) 培养7天的肝细胞^[90].

Figure 5 (Color online) Liver-on-a-chip. (a) Schematic diagram of the hepatic lobular which is the basic unit of the liver [71]; (b) hepatic lobular hexagonal structure on the chip [71], scale bar 500 μm ; (c) microfluidic chip for hepatic sinusoid [90], scale bar 50 μm ; (d) hepatocytes after 7 days of culture [90].

取的人近端肾小管上皮细胞种植在多孔薄膜上面(图6)。通过与传统培养方法比较,证明了肾脏芯片培养的细胞具有更好的生理功能。东京大学Kitamori课题组^[91]构建了一种由玻璃和聚碳酸酯膜组成的肾芯片,并在膜上包裹了基质胶(matrigel),肾近端小管上皮细胞在该芯片上培养5天后生长良好。该芯片有望在体外再现肾小管上皮细胞的分离和吸收功能。国家纳米科学中心蒋兴宇课题组^[92]采用水凝胶材料构建了模拟肾单元的器官芯片,该芯片上具有不同腔室可接种不同细胞,腔室间具有扩散效应可模拟肾小管上皮细胞的重吸收作用。

药物可引起肾脏毒性反应,对肾脏造成损伤,构建肾脏芯片研究药物毒性是器官芯片的一个重要方向。Ingber课题组^[76]在前期制备的肾脏芯片上,通过对比近端小管肾上皮细胞在肾芯片以及穿透小室(transwell)中的细胞损伤、凋亡与恢复,研究了铂化合物的肾毒性。实验发现肾芯片上的肾小管细胞与在体情况更接近,在损伤后恢复速度更快,证明了肾芯片在药物肾毒性研究领域具有重要的价值。法国贡比涅技术大学Leclerc小组^[93]将肾小管细胞接种于PDMS形成的管道中,研究了抗肿瘤药物异环磷酰胺对肾小管上皮细胞功能的影响。目前肾脏芯片已实现肾小管上皮细胞形态和功能的基本模拟,而构建肾脏芯片模拟肾小管单元的结构和功能,在重吸收功能和肾毒性的研究中具有广阔前景。

4.3 肺芯片

肺是人体重要的呼吸器官,也是气体交换的主要

图6 (网络版彩图)肾脏芯片的结构设计,可模拟流体剪切力作用下的肾小管上皮细胞^[76]

Figure 6 (Color online) The structural design of a kidney-on-a-chip, which can mimic the function of renal tubular epithelial cells under the fluid shearing force ^[76].

场所,其基本功能单位是肺泡。肺泡数量多、表面积大、生理结构复杂,这些特点给体外培养模拟肺的生理功能带来了挑战,而器官芯片的出现使得肺的体外模拟成为可能。近年来,肺芯片的研究主要集中在肺泡及呼吸膜的体外模拟,并用于肺部疾病损伤的模型构建。

Ingber课题组^[3]采用PDMS材料制备了肺芯片,芯片中集成了一层ECM包覆的多孔PDMS薄膜,用于模拟人肺中肺泡和毛细血管交接面,两侧分别种植培养肺泡上皮细胞与血管内皮细胞,如图7所示。芯片两侧包括两个微室,通过对微室抽真空可模拟呼吸运动对呼吸膜的机械拉伸作用,研究周期性应力对呼吸膜渗透性的影响、上皮细胞对炎症刺激的反应等一系列问题。这种芯片中肺上皮细胞不仅可以长期存活,并且其功能完整性、屏障作用以及分泌表面活性物质的能力都有不同程度增强。该芯片能够实现人肺泡的体外构建,可用于研究空气中纳米颗粒对肺的损伤作用。随后,美国密歇根大学Takayama小组^[94]设计了一种肺芯片用来模拟人肺泡血气屏障上的应力环境。该芯片将流体和固体机械应力单独或组合重现,可用于研究机械通气条件下的细胞损伤。该研究发现使用富含表面活性物质的培养基能够显著降低细胞损伤程度,这表

图7 (网络版彩图)人肺泡结构及肺芯片示意图及实物,该芯片可模拟肺呼吸过程中细胞承受的周期性应力,标尺200 μm^[3]

Figure 7 (Color online) Human alveolar structure and a lung-on-a-chip, including schematic diagram and real device. The chip can mimic the periodic stress experienced by cells during lung respiration, scale bar 200 μm ^[3].

明表面活性物质可以作为多种表面张力病症(如急性呼吸窘迫综合征等)的潜在治疗方法。

虽然上述肺芯片模型已经在肺疾病的研究中发挥了重要作用,但是由于肺部结构的复杂和特殊性,现有的肺芯片仍有其局限性。因此如何在芯片上更好地模拟肺部生理结构,建立一个完整的体外模型将成为肺芯片研究的重点。

4.4 肠芯片

肠是人体最大的消化器官,是消化系统中最长也是最重要的一段。小肠的主要功能是吸收功能,营养物质和药物均是通过小肠进入循环系统,因此小肠在药代动力学中发挥着重要作用。肠芯片研究的焦点主要是模拟小肠绒毛结构和再现肠吸收功能。

东京大学Fujii课题组^[95]采用PDMS材料制备了肠芯片,该芯片由两个小室构成,分别代表了小肠黏膜上皮顶端和基底外侧端,两小室由半透膜隔开,肠上皮细胞培养在顶端小室。芯片采用微泵进行周期性换液,实现了肠上皮细胞体外长期培养,将培养时间增加到了14天以上。小肠表面具有很多绒毛结构,该结构增大了小肠的内表面积,利于食物的消化和营养物质的吸收。为模拟小肠绒毛结构,Sung等人^[96]通过激光烧蚀和水凝胶翻模的方法构建了小肠上皮绒毛3D模型,并将Caco-2细胞培养于模型表面,通过该方法得到了模拟小肠绒毛结构的肠芯片。上述肠芯片实现了绒毛形貌的构建,但是构建的绒毛结构仍然为静态,在体情况下,肠道是通过不断的运动来完成食物的消化和吸收。为模拟肠的动态吸收过程,Ingber课题组^[97]设计了一种肠芯片。该芯片结构与上文中肺芯片结构类似,由两个微流体通道和一个多孔的PDMS膜构成,其中PDMS膜上包裹有人肠上皮细胞及细胞外基质。在流体通道的外侧为两个真空室,通过控制真空室压强实现PDMS薄膜的拉压过程,从而模拟肠的蠕动(图8)。该芯片可用于肠道微生物和肠上皮细胞的体外共培养,模拟肠的动态生理学功能与特征。

随着生物材料和芯片技术的发展,对肠道结构和功能的模拟也越来越精确,肠芯片在研究人体消化代谢和药代动力学方面具有巨大的应用前景。

4.5 心脏芯片

近几年,科研工作者构建了多种心脏芯片用来研

究心脏生理学以及心脏药物的高通量筛选。其主要优点是可以更好地模拟体内的细胞微环境,提高模型中物质的运输与养分的扩散,另外心脏芯片还可实现药物效应的实时动态监控。

心脏中的心肌细胞具有周期性的搏动,并且对力、电等外界刺激具有响应性,是人体比较特殊的一类细胞。美国加州大学圣迭戈分校Varghese课题组^[98]构建了心脏芯片,在PDMS薄层表面覆盖一层心肌细胞薄片,施加电刺激并观测心肌细胞的收缩性,芯片上集成的电极可实时监测细胞中肾上腺素的含量,实现数据的实时分析。心肌细胞的另一个重要特性是收缩现象,其收缩力的大小是细胞生理状态的重要指标之一。为测量心肌细胞的收缩力,Chen小组^[13,14,80]制备了微柱结构的心脏芯片(图9^[99]),Lewis课题组^[22]则构建了薄片结构的芯片,通过观测微柱或薄片结构的变形量可实现心肌细胞收缩力的测量。心脏的收缩和舒张为人体提供血液循环的动力,而心肌细胞的同步搏动则是心脏收缩的基础。Yasuda课题组^[67]采用琼脂糖制备了心脏芯片,可将单个心肌细胞种植在一个微室中,通过调控参数观察心肌细胞及周围细胞的搏动周期,证实了心肌细胞群聚效应,即搏动频率的波动幅度随着细胞数量的增加而减小,对体外构建心肌组织的尺寸大小提供了依据。

心脏芯片的另一用途是构建疾病模型进行药物筛选。西北农林科技大学王进义课题组^[100]设计了缺氧模型的心脏芯片,该芯片利用两列平行的微柱阵列构造

图8 (网络版彩图)肠芯片结构示意图及实物,通过调控两侧真空室内压强可实现多孔薄膜的周期性拉伸,模拟肠蠕动过程^[97]

Figure 8 (Color online) Schematic diagram and the real device of an intestine-on-a-chip. Periodic stretching on the porous membrane can be achieved by adjusting the pressure in vacuum chambers and thus mimic the intestinal peristalsis process ^[97].

图9 (网络版彩图)心脏芯片结构示意图及实物. (a) 通过薄片弯曲表征心肌细胞收缩力^[99], 标尺100 μm; (b) 通过微柱的变形测量心肌微组织收缩力^[80], 标尺100 μm

Figure 9 (Color online) Schematic diagram and real device of a heart-on-a-chip. (a) Characterization of myocardial cell contractile force through sheet bending ^[99], scale bar 100 μm; (b) measurement of myocardial microtissue contractile force through the deformation of micro-pillars ^[80], scale bar 100 μm.

毛细血管壁, 实现营养物质的扩散与传递, 通过控制流量来研究缺氧导致的心肌损伤. 作为心肌细胞的主要特征之一, Ca^{2+} 通道的活性直接受到疾病条件的影响. 意大利帕多瓦大学Elvassore小组^[101]设计了一个能够实时检测细胞内 Ca^{2+} 动态变化的心脏芯片, 该芯片中氧含量也是可控的. 通过测量不同氧含量下 Ca^{2+} 的动态变化, 证明了缺氧可诱导心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度的可逆变化, 该心脏芯片为后续的药物筛选提供了良好的平台.

目前心脏芯片能够模拟心肌细胞的力、电等微环境, 并可表征出心肌细胞的收缩性. 但心脏芯片仍然有很多方面需要继续探索, 例如在芯片上进行三维心肌组织培养, 能够更加真实地模拟心脏的功能. 另外, 目前的心脏芯片多采用哺乳动物的心肌细胞, 如何在芯片上培养人类心肌细胞获得更加真实的结果则是科研工作者面临的另一挑战.

4.6 肿瘤芯片

肿瘤相关疾病已经成为人类健康的最主要威胁之一. 传统的肿瘤模型多为平面培养皿上培养的单一肿瘤细胞系, 不足以模拟体内肿瘤的真实组成情况和所处环境的复杂度. 因此在芯片上重建肿瘤细胞所处微环境并观察肿瘤细胞的增殖和迁移行为, 对于研究肿瘤的生长和转移机制有重要意义.

肿瘤细胞的缺氧特性导致肿瘤组织附近易发生异

常血管增生的现象, 为此在器官芯片上制备血管结构具有重要意义, 浙江大学贺永课题组^[29,30,102,103]采用3D打印等方法在器官芯片上制备了中空的血管结构, 大连医科大学刘婷娇小组^[104]通过在芯片不同区域上同时接种人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和肿瘤细胞, 比较了不同肿瘤细胞系诱导血管生成能力的差异, 为研究血管生成过程及筛选抑制血管生成药物提供了良好的平台. 肿瘤的转移机制是肿瘤研究的另一热点, 研究肿瘤转移的影响因素可以为临床预防和控制肿瘤转移提供指导意见. 美国维克森林大学Skardal等人^[105]构建了一种肿瘤芯片, 该芯片采用循环液体连通了肠结构培养室和肝结构培养室, 可实现肿瘤细胞的实时追踪并对转移过程中肿瘤细胞和正常细胞的标志分子表达量进行了表征. 实验结果表明了该芯片平台能够再现体内肿瘤的转移特征, 可用于肿瘤的特征研究.

肿瘤芯片最重要的应用是筛选抗癌药物. 通过设计肿瘤芯片的流道结构和细胞接种方式可以快速实现药物的高通量加载(包括同种药物的不同浓度加载和不同药物的混合加载)以及细胞的响应检测, 从而实现抗癌药物的筛选和给药方案的优化(图10). 美国休斯顿大学Akay和西安交通大学仿生工程与生物力学中心合作开发了一款脑肿瘤芯片, 该芯片采用PEGDA材料可实现三维肿瘤组织的高通量制备和培养, 研究人员利用该芯片测试了匹伐他汀和伊立替康两种药物对脑肿瘤的治疗效果^[11]. 加拿大蒙特利尔大学Gervais课题组^[77]将病人的肿瘤组织进行切分后加载至肿瘤芯片中并测试了不同药物, 采用该芯片可实现药物的精准筛选, 得到不同病人适用的最佳抗癌药物种类和浓度信息. 随着制造技术的发展和进步, 肿瘤芯片在肿瘤模型构建和治疗方案探索等方面发挥着越来越重要作用.

4.7 多器官芯片

人体内的生理功能往往涉及多个器官的相互作用, 所以为研究体内代谢过程或者药物的整体药效, 需要在体外构建多个器官模型并集成, 即多器官芯片或人体芯片(human-on-a-chip), 如图11所示^[106]. 美国先进制药公司Li等人^[38]在多孔板的基础上改进制备了多器官芯片, 实现了肝细胞、肾皮质细胞、肺泡上皮细胞、星形胶质细胞、动脉血管上皮细胞以及乳腺癌细胞的共同培养, 通过培养基的扩散作用相互联通, 可用

图 10 (网络版彩图)肿瘤芯片结构设计及实物图。(a) 菲林光刻法制备的水凝胶肿瘤芯片, 可实现药物浓度的梯度分布^[11]; (b) 从病患体内之前提取肿瘤样本制备的个性化肿瘤芯片^[77]

Figure 10 (Color online) Structural design and real device of a tumor-on-a-chip. (a) Hydrogel tumor-on-a-chip fabricated by film lithography, which can realize the gradient distribution of drug concentration [11]; (b) personalized tumor-on-a-chip with tumor samples extracted from the patient's body [77].

来研究在药理作用中器官通过细胞分泌物进行的相互作用。美国康奈尔大学Shuler小组^[107]则提出了更完善的方法, 使用微流控芯片实现了多细胞的灌流培养, 可用于研究独立细胞培养体系之间的相互作用。这些工作为多器官芯片的集成提供了基础。

多器官芯片的重要应用是研究药物的吸收和药效, 药物在体内主要通过小肠吸收最终由肝脏和肾脏代谢排出, 吸收和代谢过程对药物的治疗效果有着关键影响。荷兰格罗宁根大学Groothuis课题组^[108]设计了一个由大鼠肠道与肝脏切片组织共培养的器官芯片, 通过灌流培养来模拟人体内的代谢过程。研究人员发现在上游加入胆汁分泌物会引起上游肠成纤维细胞分泌生长因子, 进而导致下游串联的肝细胞活性下降, 而

图 11 (网络版彩图)多器官芯片的结构设计。(a) 人体芯片(human-on-a-chip)的构想图^[106]; (b) 包含4种器官单元的微流控芯片结构设计图, 该芯片可模拟小肠、肝脏、皮肤以及肾的基本功能及相互作用^[110]; (c) 芯片内的流场分布及各器官单元的连接关系

Figure 11 (Color online) Structural design of the multi-organs-on-a-chip. (a) Concept map of human-on-a-chip [106]; (b) structure design diagram of a microfluidic chip containing four organ units, which can mimic the basic functions and interactions of small intestine, liver, skin and kidney [110]; (c) the flow field distribution in the chip and the connection of each organ unit.

单独培养的肝细胞并没有出现类似现象。德国柏林工业大学Marxab课题组^[109]构建了肝脏和皮肤长期共培养的多器官芯片, 该芯片上集成了微流体装置, 通过测量恒定的流量条件下葡萄糖、乳酸脱氢酶以及乳酸的浓度, 可实现细胞代谢活性的长期监测。随后该课题组将小肠、肝、肾与皮肤等细胞共培养在同一芯片上, 维持芯片组织与体内相近的血流组织比率, 通过基因分析测定该体系在2天后达到自稳态并形成功能性结构, 该芯片可模拟药物在人体内的吸收、分布、代谢和排泄过程^[110]。为了研究药物的肾毒性, 法国贡比涅技术大学Leclerc小组^[111]设计了一个肝、肾细胞共培养芯片, 结果发现在共培养体系中, 异环磷酸胺药物在肝细胞中代谢产生了具有肾毒性的氯乙醛, 导致了肾细胞数量减少, 而单独培养的肝、肾细胞体系中未发现此现象。

人体结构的复杂性促使研究人员制备更加复杂的多器官芯片, 新加坡科技研究局Yu小组^[112]设计了一个多通道的三维微流控细胞培育芯片, 在不同的通道内种植多种细胞来模拟人体内的肝、肺、肾和脂肪组

织, 并通过控制转化生长因子在不同通道的浓度, 发现肺与其他组织的反应不同, 该结果与在体的观察相同. 美国康奈尔大学Shuler课题组^[113]设计了一个多层芯片, 使用三维水凝胶培养肝脏、肿瘤和骨髓等多种细胞, 通过在芯片中加入抗癌药物5-氟尿嘧啶并检测细胞的代谢变化, 发现其药效结果与单独培养的细胞具有一定差异性. 在过去的几年中, 一些课题组将多种不同的器官结合在一起制备了多器官芯片, 其功能也在逐步完善.

5 结论与展望

本文综述了器官芯片的现状, 主要包括其发展历程、结构组成、制备方法以及在生物医学领域的应用. 器官芯片的出现依赖于微流控芯片技术和细胞体外培养技术的发展. 器官芯片是一种新兴的技术平台, 可在体外构建疾病(或正常)模型, 用于模拟体内的器官单元. 相比于动物模型和基于培养皿的细胞培养方法, 器官芯片具有便携性、高通量、可模拟在体微环境等优势. 器官芯片根据其功能的不同往往具有不同的结构, 本文通过查阅和综述现有文献, 提出集成度较高的器官芯片包括4个要素: 微流控芯片、细胞/微组织、微执行器以及微传感器. 其中前两个要素是器官芯片的必要构件, 而微执行器和微传感器则可显著提高器官芯片的集成度, 使其具有更多的功能, 同时对器官芯片的制备也提出了更高的要求. 目前器官芯片的制备方法根据其材料和结构不同也有不同选择, 其中3D打印法具有操作方便、简单快速、可一体化成形的优势, 在器官芯片的制备中具有很大潜力. 器官芯片近几年发展迅速, 在研究疾病发病机理、药物筛选等方面具有广阔的应用前景, 并且器官芯片还可推广应用到环境检测、食品药品安全检查等领域(表3). 近几年相关的科研论文和原型产品蓬勃增长. 但总的来说, 器官芯片目前仍然处在起步阶段, 其发展仍然面临多方面的挑战.

器官芯片面临的一个重要挑战是如何更好地模拟体内环境. 首先从细胞来源上, 目前的器官芯片多是采用标准细胞系. 标准细胞系的优点是采购方便, 但其缺点是不能体现个体的差异. 为此, 一些学者尝试从患者体内提取细胞, 进而在器官芯片上进行培养, 该方法可反映不同患者的个体差异, 但是从病灶部位提取细胞

并实现体外的扩增培养仍然存在众多技术挑战. 此外, 人体是非常复杂的机体, 单一种类细胞往往难以模拟完整的机体功能. 为了更好地模拟在体情况, 科研工作者已经开始将多种细胞培养在芯片上制备多器官芯片, 但如何构建适合多种细胞的微环境是多器官芯片面临的难题, 比如培养基种类的选择(通常每种细胞适合的培养基种类不同).

目前多数器官芯片的检测是在芯片上进行染色或者将细胞从芯片上消化后收集检测, 上述方法属于一次性检测且会导致细胞死亡, 而如何在芯片上实现细胞生理状态的实时无损监测是器官芯片面临的挑战之一. 如前文所述, 高度集成的器官芯片包括微传感器, 可用于细胞的力、电指标检测. 目前的微传感器实现了细胞收缩力及电学性能的实时监测, 在器官芯片上集成其他功能的微传感器, 检测细胞的其他生理指标则是器官芯片未来的发展方向.

器官芯片走向临床应用的关键是实现标准化的批量生产, 这就需要制定器官芯片的行业标准. 目前器官芯片仍处于实验室研发阶段, 各实验室制备的芯片结构尺寸、流道形状等参数各不相同, 使用的细胞类型、培养基种类、浓度、进样量等也不同. 为规范器官芯片的制备和使用过程, 需制定器官芯片以及灌流培养设备相应的行业标准.

器官芯片的高通量是其重要的优势, 也是实际应用中所必备的特征. 通常器官芯片采用光刻等微纳技术或者3D打印技术来制备, 在芯片上可集成多组实验样品. 目前的器官芯片多采用数十个或上百个微组织阵列, 但有些芯片则只包含单个微组织, 这种器官芯片的主要用途是在实验室中用于模型验证或者结果展示, 将其扩展至高通量不存在原理方面的障碍. 但仍有几个方面需要注意: (1) 细胞/微组织的制备不能采用手动滴加法, 而应采用细胞/微组织的自动捕获收集方法; (2) 各组织单元间要做好隔离, 每个样本可实现物理/化学微环境的独立控制和结果的读取, 避免相互干扰.

另外, 临床应用的器官芯片制备和使用往往分布在不同地方, 并且芯片还要满足用户的即用即用, 这就涉及器官芯片的保存. 由于芯片上的细胞具有生命周期, 常温条件下细胞会生长、分化、增殖、凋亡. 为保证细胞的生理状态, 芯片的保存可以借鉴生殖医学中常用的冷冻保存的方式, 采用低温的方式终止细

表 3 器官芯片的主要进展总结

Table 3 Summary of the main progress of organ-on-a-chip

器官种类	结构组成 ^{a)}	主要材料	加工方法	细胞类型	主要功能
肝脏	A+B ^[26,60,68,86,88,90] A+B+D ^[71,87]	玻璃 ^[71] PDMS ^[88] 聚己内酯 ^[60] 玻璃+PDMS ^[26,68,86,90] 环烯烃共聚物 ^[87]	模塑法 ^[26,68,86-88,90] 3D打印 ^[114] 经典光刻 ^[71]	肝癌细胞 ^[26,60,71,86] 肝实质细胞 ^[68,87,88,90]	药物代谢 ^[26] 肝小叶结构 ^[71,87,90] 药物肝毒性测试 ^[26,90]
肾脏	A+B ^[76,91,92] A+B+D ^[78]	玻璃 ^[91] 水凝胶 ^[92] PDMS ^[76,78]	模塑法 ^[76,78,92] 经典光刻 ^[91]	肾足突细胞 ^[78] 肾小管上皮细胞 ^[76,91,92]	蛋白转运 ^[76,78] 葡萄糖重吸收 ^[76] 药物肾毒性测试 ^[76,78]
肺	A+B ^[3,94] A+B+D ^[3,94]	PDMS ^[3,94]	模塑法 ^[3,94]	肺泡上皮细胞 ^[3,94]	肺炎模型 ^[3] 纳米颗粒毒性 ^[3] 肺泡呼吸过程 ^[3,94]
肠	A+B ^[95,96] A+B+D ^[16,97]	PDMS ^[16,95,97] 水凝胶 ^[96]	模塑法 ^[16,95-97]	结直肠腺癌细胞 ^[16,95-97]	肠吸收 ^[95] 肠蠕动 ^[16,96] 小肠绒毛结构 ^[16,96,97]
心脏	A+B ^[67,100] A+B+C ^[13,80,85,98] A+B+D ^[101] A+B+C+D ^[22,84]	纸 ^[32] 聚乳酸 ^[22] 水凝胶 ^[67] PDMS ^[13,22,80] PDMS+玻 璃 ^[84,85,98,100,101] 丙烯酸-丁二烯-苯乙 烯塑料 ^[22]	模塑法 ^[13,80,84,85,98,101] 3D打印 ^[22] 激光刻蚀法 ^[67]	心肌细胞 ^[67,84,85,98,100,101] 成纤维细胞 ^[13,80,114]	药物测试 ^[22,67,84,85,98] 心肌缺血反应 ^[32,100,101] 细胞收缩力测 量 ^[13,22,80,84,98] 细胞跳动频率测 量 ^[22,84,98]
肿瘤	A+B ^[11,27,77,104,105]	纸 ^[31] PDMS ^[77,105] PDMS+玻璃 ^[104] 水凝胶+玻璃 ^[11,27]	菲林光刻 ^[11,27] 模塑法 ^[77,104,105]	肺癌细胞 ^[27] 肝癌细胞 ^[105] 乳腺癌细胞 ^[31] 卵巢癌细胞 ^[77] 结肠癌细胞 ^[105] 前列腺癌细胞 ^[77] 口腔鳞状癌细胞 ^[104] 胶质母细胞瘤细胞 ^[11]	癌细胞迁移 ^[105] 肿瘤血管再生 ^[104] 三维癌细胞球 ^[11,77] 抗癌药物筛选 ^[11,77]
多器官	A+B ^[38,108-113]	PDMS ^[108,110,111,113] PDMS+玻璃 ^[109,112]	模塑法 ^[108-110,112,113]	肝癌细胞+皮肤活体组织 ^[109] 肝癌细胞+肾脏上皮细胞 ^[111] 肝脏组织切片+小肠组织切片 ^[108] 小肠上皮细胞+肝癌细胞+肾脏上 皮细胞+皮肤活体组织 ^[110] 肝癌细胞+肺癌细胞 ^[112] +肾脏上皮细胞+脂肪细胞 ^[112] 结肠癌细胞+肝癌细胞 ^[113] +成髓细胞 ^[113]	药物代谢 ^[108,109,111-113] 药物毒性测试 ^[38,113]

a) A代表微流控芯片本体, B代表细胞/微组织, C代表微传感器, D代表微执行器。

胞的生理活动, 待使用时对芯片升温, 从而解冻复苏。但目前的技术可实现较少数量细胞的冷冻保存, 其冻

存过程涉及传热学、流体力学等多个领域, 如何冻存整个芯片还面临较大的理论和技术挑战。

参考文献

- Campbell T C, Campbell II T M. Zhang Y H, translated. Chinese Health Survey Report (in Chinese). Changchun: Jilin Literature and History Press, 2006 [坎贝尔·柯林, 坎贝尔·托马斯. 张宇晖, 译. 中国健康调查报告. 长春: 吉林文史出版社, 2006]
- Burns M A, Johnson B N, Brahmasandra S N, et al. An integrated nanoliter DNA analysis device. *Science*, 1998, 282: 484-487
- Huh D, Matthews B D, Mammoto A, et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science*, 2010, 328: 1662-1668

- 4 Situ Z Q, Wu J Z. Cell Culture (in Chinese). Xi'an: World Book Publishing Company, 1996 [司徒镇强, 吴军正. 细胞培养. 西安: 世界图书出版公司, 1996]
- 5 Editorial. Goodbye, flat biology? *Nature*, 2003, 424: 861
- 6 Qin J H, Zhang M, Yu H, et al. Human organs-on-a-chips (in Chinese). *Bull Chin Acad Sci*, 2017, 32: 1281–1289 [秦建华, 张敏, 于浩, 等. 人体器官芯片. 中国科学院院刊, 2017, 32: 1281–1289]
- 7 Lin B C, Qin J H. Graphical Microfluidic Chip Lab (in Chinese). Beijing: Science Press, 2008 [林炳承, 秦建华. 图解微流控芯片实验室. 北京: 科学出版社, 2008]
- 8 Liu H, Huang G Y, Li Y H, et al. Advances in hydrogel-based bottom-up tissue engineering (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2015, 45: 256–270 [刘灏, 黄国友, 李显辉, 等. 基于水凝胶的“自下而上”组织工程技术研究进展. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 256–270]
- 9 Zheng F, Fu F, Cheng Y, et al. Organ-on-a-chip systems: Microengineering to biomimic living systems. *Small*, 2016, 12: 2253–2282
- 10 Sun W, Chen Y Q, Luo G A, et al. Organs-on-chips and its applications (in Chinese). *Chin J Anal Chem*, 2016, 44: 533–541 [孙威, 陈雨晴, 罗国安, 等. 器官芯片及其应用. 分析化学, 2016, 44: 533–541]
- 11 Fan Y, Nguyen D T, Akay Y, et al. Engineering a brain cancer chip for high-throughput drug screening. *Sci Rep*, 2016, 6: 25062
- 12 Li X, Tian H, Shao J, et al. Electrically modulated microtransfer molding for fabrication of micropillar arrays with spatially varying heights. *Langmuir*, 2013, 29: 1351–1355
- 13 Tan J L, Tien J, Pirone D M, et al. Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 1484–1489
- 14 Fu J, Wang Y K, Yang M T, et al. Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates. *Nat Methods*, 2010, 7: 733–736
- 15 Tseng P, Di Carlo D. Substrates with patterned extracellular matrix and subcellular stiffness gradients reveal local biomechanical responses. *Adv Mater*, 2014, 26: 1242–1247
- 16 Kim H J, Ingber D E. Gut-on-a-chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation. *Integr Biol*, 2013, 5: 1130–11340
- 17 Li Y, Huang G, Li M, et al. An approach to quantifying 3D responses of cells to extreme strain. *Sci Rep*, 2016, 6: 19550
- 18 Wang D, Xie Y, Yuan B, et al. A stretching device for imaging real-time molecular dynamics of live cells adhering to elastic membranes on inverted microscopes during the entire process of the stretch. *Integr Biol*, 2010, 2: 288–293
- 19 Qi Y X, Qu M J, Long D K, et al. Rho-GDP dissociation inhibitor alpha downregulated by low shear stress promotes vascular smooth muscle cell migration and apoptosis: A proteomic analysis. *Cardiovascul Res*, 2008, 80: 114–122
- 20 Zheng W, Jiang B, Wang D, et al. A microfluidic flow-stretch chip for investigating blood vessel biomechanics. *Lab Chip*, 2012, 12: 3441–3450
- 21 Zeck G, Fromherz P. Noninvasive neuroelectronic interfacing with synaptically connected snail neurons immobilized on a semiconductor chip. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 10457–10462
- 22 Lind J U, Busbee T A, Valentine A D, et al. Instrumented cardiac microphysiological devices via multimaterial three-dimensional printing. *Nat Mater*, 2016, 16: 303–308
- 23 Park J W, Vahidi B, Taylor A M, et al. Microfluidic culture platform for neuroscience research. *Nat Protoc*, 2006, 1: 2128–2136
- 24 Taylor A M, Blurton-Jones M, Rhee S W, et al. A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat Methods*, 2005, 2: 599–605
- 25 Shirure V S, George S C. Design considerations to minimize the impact of drug absorption in polymer-based organ-on-a-chip platforms. *Lab Chip*, 2017, 17: 681–690
- 26 Ma B, Zhang G, Qin J, et al. Characterization of drug metabolites and cytotoxicity assay simultaneously using an integrated microfluidic device. *Lab Chip*, 2009, 9: 232–238
- 27 Huo D Q, Guo M Y, Deng Y, et al. Development of 3D hydrogel microfluidic chip for lung cancer cells capture and detection (in Chinese). *Chin J Analyt Chem*, 2015, 43: 1801–1807 [霍丹群, 郭明遗, 邓艳, 等. 基于3D水凝胶微孔阵列芯片的肺癌细胞检测. 分析化学, 2015, 43: 1801–1807]
- 28 Huo D Q, Fang K J, Hou C J, et al. Rapid fabrication of hydrogel microfluidic chip and its application for cell metabolites detection (in Chinese). *Chem J Chin Univ*, 2013, 34: 1327–1332 [霍丹群, 方可敬, 侯长军, 等. 水凝胶微流控芯片的快速加工及在细胞培养检测中的应用. 高等学校化学学报, 2013, 34: 1327–1332]

- 29 Gao Q, Liu Z, Lin Z, et al. 3D bioprinting of vessel-like structures with multilevel fluidic channels. *ACS Biomater Sci Eng*, 2017, 3: 399–408
- 30 Nie J, Gao Q, Wang Y, et al. Vessel-on-a-chip with hydrogel-based microfluidics. *Small*, 2018, 14: 1802368
- 31 Derda R, Laromaine A, Mammoto A, et al. Paper-supported 3D cell culture for tissue-based bioassays. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 18457–18462
- 32 Mosadegh B, Dabiri B E, Lockett M R, et al. Three-dimensional paper-based model for cardiac ischemia. *Adv Healthcare Mater*, 2014, 3: 1036–1043
- 33 Wu Y, Gao Q, Nie J, et al. From microfluidic paper-based analytical devices to paper-based biofluidics with integrated continuous perfusion. *ACS Biomater Sci Eng*, 2017, 3: 601–607
- 34 He Y, Wu Y, Fu J Z, et al. Fabrication of paper-based microfluidic analysis devices: A review. *RSC Adv*, 2015, 5: 78109–78127
- 35 He Y, Gao Q, Wu W B, et al. 3D printed paper-based microfluidic analytical devices. *Micromachines*, 2016, 7: 108
- 36 Ng K, Gao B, Yong K W, et al. Paper-based cell culture platform and its emerging biomedical applications. *Mater Today*, 2017, 20: 32–44
- 37 Yang Q, Lian Q, Xu F. Perspective: Fabrication of integrated organ-on-a-chip via bioprinting. *Biomicrofluidics*, 2017, 11: 031301
- 38 Li A P, Bode C, Sakai Y. A novel *in vitro* system, the integrated discrete multiple organ cell culture (IdMOC) system, for the evaluation of human drug toxicity: Comparative cytotoxicity of tamoxifen towards normal human cells from five major organs and MCF-7 adenocarcinoma breast cancer cells. *Chemico-Biol Interact*, 2004, 150: 129–136
- 39 Yin X F, Fang Q, Ling Y Y. Microfabrication techniques for production of microfluidic chips (in Chinese). *Modern Sci Instrum*, 2001, 4: 10–14 [殷学锋, 方群, 凌云扬. 微流控分析芯片的加工技术. 现代科学仪器, 2001, 4: 10–14]
- 40 Fang Z L. Microfluidic Analysis Chip (in Chinese). Beijing: Science Press, 2003 [方肇伦. 微流控分析芯片. 北京: 科学出版社, 2003]
- 41 Wang G B. A Review of the Frontiers of Nanomanufacturing (in Chinese). Beijing: Science Press, 2009 [王国彪. 纳米制造前沿综述. 北京: 科学出版社, 2009]
- 42 Jiang C, Li X, Tian H, et al. Lateral flow through a parallel gap driven by surface hydrophilicity and liquid edge pinning for creating microlens array. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6: 18450–18456
- 43 Li X, Tian H, Wang C, et al. Electrowetting assisted air detrapping in transfer micromolding for difficult-to-mold microstructures. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6: 12737–12743
- 44 Li X, Ding Y, Shao J, et al. Fabrication of microlens arrays with well-controlled curvature by liquid trapping and electrohydrodynamic deformation in microholes. *Adv Mater*, 2012, 24: OP165–OP169
- 45 Li X, Ding Y, Shao J, et al. Fabrication of concave microlens arrays using controllable dielectrophoretic force in template holes. *Opt Lett*, 2011, 36: 4083–4085
- 46 Martynova L, Locascio L E, Gaitan M, et al. Fabrication of plastic microfluid channels by imprinting methods. *Anal Chem*, 1997, 69: 4783–4789
- 47 Versaevol M, Grevesse T, Gabriele S. Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endothelial cells. *Nat Commun*, 2012, 3: 671
- 48 Grevesse T, Versaevol M, Circelli G, et al. A simple route to functionalize polyacrylamide hydrogels for the independent tuning of mechanotransduction cues. *Lab Chip*, 2013, 13: 777–780
- 49 He S, Chen F, Liu K, et al. Fabrication of three-dimensional helical microchannels with arbitrary length and uniform diameter inside fused silica. *Opt Lett*, 2012, 37: 3825–3827
- 50 He S, Chen F, Yang Q, et al. Facile fabrication of true three-dimensional microcoils inside fused silica by a femtosecond laser. *J Micromech Microeng*, 2012, 22: 105017
- 51 Liu K, Yang Q, Zhao Y, et al. Three-dimensional metallic microcomponents achieved in fused silica by a femtosecond-laser-based microsolidifying process. *Microelectron Eng*, 2014, 113: 93–97
- 52 Luo Y, Wang X D, Wang L D. Bonding techniques for fabrication of thermoplastic microfluidic chips (in Chinese). *China Mech Eng*, 2008, 19: 3012–3018 [罗怡, 王晓东, 王立鼎. 聚合物微流控芯片的键合技术与方法. 中国机械工程, 2008, 19: 3012–3018]
- 53 Wu H, Huang B, Zare R N. Construction of microfluidic chips using polydimethylsiloxane for adhesive bonding. *Lab Chip*, 2005, 5: 1393–1398
- 54 Samel B, Chowdhury M K, Stemme G. The fabrication of microfluidic structures by means of full-wafer adhesive bonding using a poly-(dimethylsiloxane) catalyst. *J Micromech Microeng*, 2007, 17: 1710–1714
- 55 Duffy D C, McDonald J C, Schueller O J A, et al. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Anal Chem*, 1998, 70:

- 4974–4984
- 56 He Y, Wu Y, Fu J Z, et al. Developments of 3D printing microfluidics and applications in chemistry and biology: A review. [Electroanalysis](#), 2016, 28: 1658–1678
- 57 Nie J, Gao Q, Qiu J J, et al. 3D printed Lego[®]-like modular microfluidic devices based on capillary driving. [Biofabrication](#), 2018, 10: 035001
- 58 Lipson H, Kurman M. Fabricated: The New World of 3D Printing. Hoboken: John Wiley & Sons, 2013
- 59 Lan H B, Li D C, Lu B H. Micro- and nanoscale 3D printing (in Chinese). [Sci Sin Tech](#), 2015, 45: 919–940 [兰红波, 李涤尘, 卢秉恒. 微纳尺度3D打印. 中国科学: 技术科学, 2015, 45: 919–940]
- 60 Lee H, Cho D W. One-step fabrication of an organ-on-a-chip with spatial heterogeneity using a 3D bioprinting technology. [Lab Chip](#), 2016, 16: 2618–2625
- 61 Johnson B N, Lancaster K Z, Hogue I B, et al. 3D printed nervous system on a chip. [Lab Chip](#), 2016, 16: 1393–1400
- 62 Urrios A, Parra-Cabrera C, Bhattacharjee N, et al. 3D-printing of transparent bio-microfluidic devices in PEG-DA. [Lab Chip](#), 2016, 16: 2287–2294
- 63 Yi H G, Lee H, Cho D W. 3D printing of organs-on-chips. [Bioengineering](#), 2017, 4: 10
- 64 Dixon C, Lamanna J, Wheeler A R. Printed microfluidics. [Adv Funct Mater](#), 2017, 27: 1604824
- 65 He Y, Qiu J, Fu J, et al. Printing 3D microfluidic chips with a 3D sugar printer. [Microfluid Nanofluid](#), 2015, 19: 447–456
- 66 Qiu J, Gao Q, Zhao H, et al. Rapid customization of 3D integrated microfluidic chips via modular structure-based design. [ACS Biomater Sci Eng](#), 2017, 3: 2606–2616
- 67 Kaneko T, Kojima K, Yasuda K. An on-chip cardiomyocyte cell network assay for stable drug screening regarding community effect of cell network size. [Analyst](#), 2007, 132: 892–898
- 68 Schepers A, Li C, Chhabra A, et al. Engineering a perfusable 3D human liver platform from iPS cells. [Lab Chip](#), 2016, 16: 2644–2653
- 69 Yao B, Luo G, Feng X, et al. A microfluidic device based on gravity and electric force driving for flow cytometry and fluorescence activated cell sorting. [Lab Chip](#), 2004, 4: 603–607
- 70 Toriello N M, Douglas E S, Mathies R A. Microfluidic device for electric field-driven single-cell capture and activation. [Anal Chem](#), 2005, 77: 6935–6941
- 71 Ho C T, Lin R Z, Chen R J, et al. Liver-cell patterning lab chip: Mimicking the morphology of liver lobule tissue. [Lab Chip](#), 2013, 13: 3578–3587
- 72 No D Y, Lee K H, Lee J, et al. 3D liver models on a microplatform: Well-defined culture, engineering of liver tissue and liver-on-a-chip. [Lab Chip](#), 2015, 15: 3822–3837
- 73 Wang M M, Tu E, Raymond D E, et al. Microfluidic sorting of mammalian cells by optical force switching. [Nat Biotechnol](#), 2005, 23: 83–87
- 74 Kang A R, Seo H I, Chung B G, et al. Concave microwell array-mediated three-dimensional tumor model for screening anticancer drug-loaded nanoparticles. [Nanomed-Nanotechnol Biol Med](#), 2015, 11: 1153–1161
- 75 Yeon S E, No D Y, Lee S H, et al. Application of concave microwells to pancreatic tumor spheroids enabling anticancer drug evaluation in a clinically relevant drug resistance model. [PLoS ONE](#), 2013, 8: e73345
- 76 Jang K J, Mehr A P, Hamilton G A, et al. Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment. [Integr Biol](#), 2013, 5: 1119–1129
- 77 Astolfi M, Péant B, Lateef M A, et al. Micro-dissected tumor tissues on chip: An *ex vivo* method for drug testing and personalized therapy. [Lab Chip](#), 2016, 16: 312–325
- 78 Musah S, Mammoto A, Ferrante T C, et al. Mature induced-pluripotent-stem-cell-derived human podocytes reconstitute kidney glomerular-capillary-wall function on a chip. [Nat Biomed Eng](#), 2017, 1: 0069
- 79 van der Meer A D, Orlova V V, ten Dijke P, et al. Three-dimensional co-cultures of human endothelial cells and embryonic stem cell-derived pericytes inside a microfluidic device. [Lab Chip](#), 2013, 13: 3562–3568
- 80 Legant W R, Pathak A, Yang M T, et al. Microfabricated tissue gauges to measure and manipulate forces from 3D microtissues. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2009, 106: 10097–10102
- 81 Du Y, Hancock M J, He J, et al. Convection-driven generation of long-range material gradients. [Biomaterials](#), 2010, 31: 2686–2694
- 82 Qi Y X, Jiang J, Jiang X H, et al. PDGF-BB and TGF- β 1 on cross-talk between endothelial and smooth muscle cells in vascular remodeling induced by low shear stress. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2011, 108: 1908–1913

- 83 Zhang X J, Yang Z, Wang Z Y, et al. Impact of temperature profile on growth and proliferation of myoblasts on ito glass chips (in Chinese). *Chin J Anal Chem*, 2013, 41: 1171–1176 [张晓娟, 杨忠, 王振宇, 等. ITO玻璃芯片上温度分布对成肌细胞生长增殖的影响. *分析化学*, 2013, 41: 1171–1176]
- 84 Fu F F, Shang L R, Chen Z Y, et al. Bioinspired living structural color hydrogels. *Sci Robot*, 2018, 3: eaar8580
- 85 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. *Lab Chip*, 2017, 17: 2294–2302
- 86 Snyder J E, Hamid Q, Wang C, et al. Bioprinting cell-laden matrigel for radioprotection study of liver by pro-drug conversion in a dual-tissue microfluidic chip. *Biofabrication*, 2011, 3: 034112
- 87 Schütte J, Hagmeyer B, Holzner F, et al. “Artificial micro organs”—A microfluidic device for dielectrophoretic assembly of liver sinusoids. *Biomed Microdevic*, 2011, 13: 493–501
- 88 Hegde M, Jindal R, Bhushan A, et al. Dynamic interplay of flow and collagen stabilizes primary hepatocytes culture in a microfluidic platform. *Lab Chip*, 2014, 14: 2033–2039
- 89 Kostadinova R, Boess F, Applegate D, et al. A long-term three dimensional liver co-culture system for improved prediction of clinically relevant drug-induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 268: 1–16
- 90 Lee P J, Hung P J, Lee L P. An artificial liver sinusoid with a microfluidic endothelial-like barrier for primary hepatocyte culture. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 97: 1340–1346
- 91 Gao X, Tanaka Y, Sugii Y, et al. Basic structure and cell culture condition of a bioartificial renal tubule on chip towards a cell-based separation microdevice. *Anal Sci*, 2011, 27: 907–912
- 92 Mu X, Zheng W, Xiao L, et al. Engineering a 3D vascular network in hydrogel for mimicking a nephron. *Lab Chip*, 2013, 13: 1612–1618
- 93 Wilmer M J, Ng C P, Lanz H L, et al. Kidney-on-a-chip technology for drug-induced nephrotoxicity screening. *Trends Biotech*, 2016, 34: 156–170
- 94 Douville N J, Zamankhan P, Tung Y C, et al. Combination of fluid and solid mechanical stresses contribute to cell death and detachment in a microfluidic alveolar model. *Lab Chip*, 2011, 11: 609–619
- 95 Kimura H, Yamamoto T, Sakai H, et al. An integrated microfluidic system for long-term perfusion culture and on-line monitoring of intestinal tissue models. *Lab Chip*, 2008, 8: 741–746
- 96 Sung J H, Yu J, Luo D, et al. Microscale 3-D hydrogel scaffold for biomimetic gastrointestinal (GI) tract model. *Lab Chip*, 2011, 11: 389–392
- 97 Kim H J, Huh D, Hamilton G, et al. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. *Lab Chip*, 2012, 12: 2165–2174
- 98 Aung A, Bhullar I S, Theprungsirikul J, et al. 3D cardiac tissues within a microfluidic device with real-time contractile stress readout. *Lab Chip*, 2016, 16: 153–162
- 99 Feinberg A W, Feigel A, Shevkoplyas S S, et al. Muscular thin films for building actuators and powering devices. *Science*, 2007, 317: 1366–1370
- 100 Ren L, Liu W, Wang Y, et al. Investigation of hypoxia-induced myocardial injury dynamics in a tissue interface mimicking microfluidic device. *Anal Chem*, 2013, 85: 235–244
- 101 Martewicz S, Michielin F, Serena E, et al. Reversible alteration of calcium dynamics in cardiomyocytes during acute hypoxia transient in a microfluidic platform. *Integr Biol*, 2012, 4: 153–164
- 102 Nie J, Gao Q, Xie C, et al. Construction of multi-scale vascular chips and modelling of the interaction between tumours and blood vessels. *Mater Horiz*, 2020, 7: 82–92
- 103 Gao Q, He Y, Fu J, et al. Coaxial nozzle-assisted 3D bioprinting with built-in microchannels for nutrients delivery. *Biomaterials*, 2015, 61: 203–215
- 104 Liu L, Xie Z, Zhang W, et al. Biomimetic tumor-induced angiogenesis and anti-angiogenic therapy in a microfluidic model. *RSC Adv*, 2016, 6: 35248–35256
- 105 Skardal A, Devarasetty M, Forsythe S, et al. A reductionist metastasis-on-a-chip platform for *in vitro* tumor progression modeling and drug screening. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113: 2020–2032
- 106 Huh D, Hamilton G A, Ingber D E. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol*, 2011, 21: 745–754
- 107 Sin A, Chin K C, Jamil M F, et al. The design and fabrication of three-chamber microscale cell culture analog devices with integrated dissolved

- oxygen sensors. *Biotechnol Prog*, 2008, 20: 338–345
- 108 van Midwoud P M, Merema M T, Verpoorte E, et al. A microfluidic approach for *in vitro* assessment of interorgan interactions in drug metabolism using intestinal and liver slices. *Lab Chip*, 2010, 10: 2778–2786
- 109 Wagner I, Materne E M, Brincker S, et al. A dynamic multi-organ-chip for long-term cultivation and substance testing proven by 3D human liver and skin tissue co-culture. *Lab Chip*, 2013, 13: 3538–3547
- 110 Maschmeyer I, Lorenz A K, Schimek K, et al. A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents. *Lab Chip*, 2015, 15: 2688–2699
- 111 Choucha-Snouber L, Aninat C, Grsicom L, et al. Investigation of ifosfamide nephrotoxicity induced in a liver-kidney co-culture biochip. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110: 597–608
- 112 Zhang C, Zhao Z, Rahim N A A, et al. Towards a human-on-chip: Culturing multiple cell types on a chip with compartmentalized microenvironments. *Lab Chip*, 2009, 9: 3185–3192
- 113 Sung J H, Kam C, Shuler M L. A microfluidic device for a pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model on a chip. *Lab Chip*, 2010, 10: 446
- 114 Berthier J. *Micro-Drops and Digital Microfluidics*. 2nd ed. Oxford: Elsevier, 2008

Organ-on-a-chip: Fabrication methods and biomedical applications

YANG QingZhen^{1,2}, LÜ XueMeng^{1,2}, LIU Yan^{1,2}, ZHANG Hui^{1,2}, JI Yuan^{1,2} & GAO Bin³

¹ Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of the Ministry of Education, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China;

² Bioinspired Engineering and Biomechanics Center (BEBC), Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China;

³ Department of Endocrinology, Tangdu Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710038, China

Organ-on-a-chip has emerged as a new technique for constructing normal or diseased models *in vitro*, attracting rapidly increasing attention from researchers and clinics. Similar to other traditional methods, the main advantages of organ-on-a-chip are its high portability, high throughput and ability to replicate microenvironment cells. Thus organ-on-a-chip holds great potential in disease pathogenesis study, drug screening, etc. In this paper, we reviewed the history of organ-on-a-chip and discussed the main constitutions and materials of organs-on-chips. Through evaluating the existing organs-on-chips, we proposed that a highly integrated organ-on-a-chip should include four elements, microfluidic chip, cells or microtissues, microenvironment building implementing parts, and microsensors. The manufacturing methods were summarized for each item. Besides, the latest developments in organ-on-a-chip and clinical technology problems have been added. In the end, this paper addressed organ-on-a-chip's future directions.

organ-on-a-chip, microfluidics, diseased model, cell culture *in vitro*, drug screening

doi: [10.1360/SST-2019-0384](https://doi.org/10.1360/SST-2019-0384)