

DOI: 10.13376/j.cblls/2022095

文章编号: 1004-0374(2022)07-0863-08

肺芯片的构建及其在肺疾病中的仿生应用

李逸轩^{1,2}, 杨爽^{1,2}, 朱彦^{1,2}, 毛红菊^{3*}, 杨剑^{1,2*}

(1 天津中医药大学, 国家组分中药重点实验室, 天津 301617; 2 天津中医药大学, 天津市中药药理学重点实验室, 天津 301617; 3 中国科学院上海微系统与信息技术研究所, 传感技术联合国家重点实验室, 上海 200050)

摘要: 随着微工程的快速发展, 多学科交叉产物——微流控器官芯片以其能高度模拟体内微环境、便捷测定生理参数等优点, 成为最具价值的动物替代模型之一。新冠疫情肆虐, 使得肺芯片的构建及应用越来越广泛, 其高度模拟了体内肺组织微环境, 包括可溶性细胞因子的表达和细胞-细胞间、细胞-细胞外基质间的相互作用, 通过体外诱导及给药可探究多种相关细胞因子的表达, 达到快速筛药的目的。该文主要阐述了两种类型的肺芯片, 即肺泡芯片和小气道芯片, 总结其在肺疾病的仿生应用和快速药物筛选中的现况, 期望为肺芯片的精准、广泛使用提供有效的科学定位和依据。

关键词: 肺泡芯片; 小气道芯片; 肺疾病; 快速筛药

中图分类号: Q819; R318 文献标志码: A

Construction of a pulmonary organ chip and its bionic applications

LI Yi-Xuan^{1,2}, YANG Shuang^{1,2}, ZHU Yan^{1,2}, MAO Hong-Ju^{3*}, YANG Jian^{1,2*}

(1 State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 2 Tianjin Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 3 State Key Laboratory of Transducer Technology, Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China)

Abstract: With the rapid development of micro-engineering technologies, organs-on-chips as the multi-disciplinary product, has become one of the most valuable animal alternative models. It highly simulates the micro-environment *in vivo* and the physiological parameters can be accurately measured. The construction and application of lung chips are increasingly extensive with the spread of COVID-19. It highly mimics the micro-environment of lung tissue *in vivo*, including the expression of specific soluble cytokines, cell-cell and cell-extracellular matrix interactions. Through the stimulus induction and drug administrations on the chips, we can achieve the purpose of rapid drug screening via testing the expression of a variety of related cytokines. Thus, this article mainly describes two types of lung chips—alveolar chips and small airway chips, and summarizes the current status of their applications in lung disease bionics and rapid drug screening, so as to present the scientific evidence regarding the accurate and widespread use of lung chips.

Key words: alveolus-on-a-chip; small airway-on-a-chip; lung disease; rapid drug screening

微环境是指细胞生活的外围环境的总和, 主要包括在生物力学影响状态下的可溶性细胞因子和细胞-细胞间、细胞-细胞外基质间的相互作用^[1]。二维的细胞培养由于难以模拟器官的复杂程度以及细胞间的相互串扰^[2], 且会因为细胞极性的丧失影响其胞内的信号通路^[3], 使得其广泛运用受到了限制。近年来, 细胞多维度培养技术、离体组织培养

技术及生物力学相关技术等的运用, 为体外组织和器官微环境的构建和研究提供了可能性^[4]。

收稿日期: 2021-11-09; 修回日期: 2021-11-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(61971410, 62001458, 82074032)

*通信作者: E-mail: hjmao@mail.sim.ac.cn (毛红菊); wosyjianya@126.com (杨剑)

随着微工程的快速发展,多学科交叉产物——微流控器官芯片以其能高度模拟体内组织/器官微环境、便捷测定生理参数等优点,在体外组织/器官构建研究上得到了广泛的开发和运用。它是基于微芯片制造技术设计出的多通道微流体细胞培养设备,可通过在连续灌流的微米级腔道中培养细胞,经过长时间的流体力学作用,高度模拟体内组织和器官的生理功能^[5]。与静态三维培养相比,微系统工程构建的器官芯片可实现与传感器的集成使用,能精准监测微量变化的生理指标,以实现高通量、自动化、实时多指标的检测目的^[5]。相比而言,常用的动物模型因其模型构建耗时、与人体特性差异大、伦理道德等因素,使用有很大的局限^[3]。

目前已有多种器官芯片被报道,包括肝脏芯片^[6]、小肠芯片^[7]、皮肤芯片^[8]、心脏芯片^[9]、肺芯片^[10]、脂肪芯片^[11]、骨芯片^[12]等,其中,肺芯片是最早被构建的器官芯片之一。肺上皮细胞、肺成纤维细胞、细胞外基质共同构成复杂的肺上皮组织,与肺微血管内皮进行组织-组织间的信号传递^[13]。微血管血液流动的剪切应力以及呼吸循环运动的拉伸应力共同构成肺部物理微环境^[10]。肺微流控芯片通过构建气体流道与血液流道,模拟体内血液流动和呼吸运动,实现体外构建肺部微环境^[14]。

本文主要叙述了模拟肺部微环境的两种肺芯片——肺泡芯片及小气道芯片,包括构建芯片常见的细胞种类,并阐述了运用这些细胞构建肺芯片的优劣势;另一方面,在芯片装置设计上介绍了真空填充、传感器集成、主被动泵联用等多种技术,以及它们如何实现了肺部物理机械力的还原;最后,这些肺芯片如何仿生模拟肺部疾病,并进行药物筛选也得到了系统阐述。通过对肺芯片的构建、机理及应用的全面介绍,本文期望为肺芯片的精准、广泛使用提供有效的科学定位和依据。

1 肺泡芯片

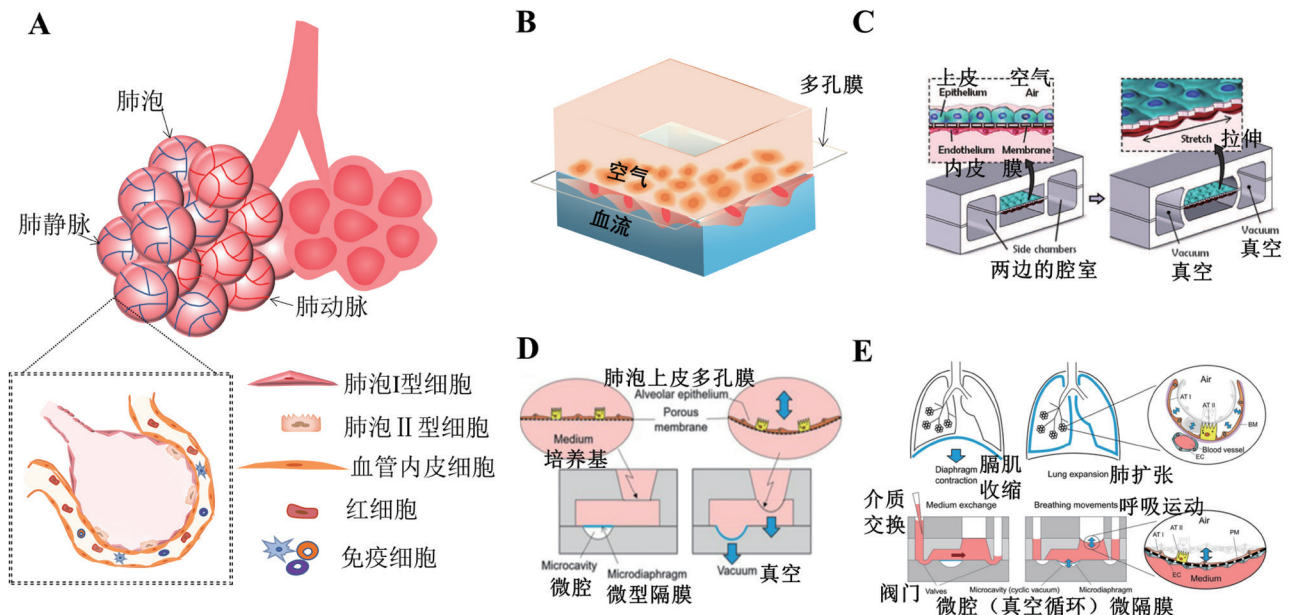
肺是人体主要的呼吸器官,其组织构成复杂而又精确,具有独特的气液交换界面——呼吸膜^[15],因此体外构建肺部微环境仿生模型一直是一大难点。呼吸膜作为肺泡-毛细血管屏障或空气-血液屏障,是肺部气体交换的主要场所^[16]。如图1A所示,呼吸膜是一个只有几微米的超薄界面,在人体正常呼吸时进行有节奏的膨胀和收缩,使肺部细胞不断受到各种外力的作用^[17-18]。模拟肺呼吸膜是研究肺部相关疾病的关键。本章节将重点阐述肺泡芯片如

何模拟肺呼吸膜,以及其中涉及的细胞类型、装置设计思路和相关疾病模型的构建方法。

1.1 原代细胞/细胞系

肺泡芯片的构建一般包括多种细胞,如肺泡上皮细胞、血管内皮细胞,细胞类型多样,其中肺泡上皮细胞涵括人肺泡上皮原代细胞、人肺泡II型上皮细胞(A549)、人细支气管上皮细胞(NCI H441)、大鼠I型肺泡上皮细胞(R3/1)、小鼠II型肺泡上皮细胞(MLE-12或MLE-15)等^[19]。例如,肺泡I型上皮细胞(AECI)大而扁平,覆盖了肺泡的大部分表面,细胞质内有多个吞饮小叶,几乎没有细胞器,主要提供肺泡屏障,是气体交换的主要部位^[20-21]。肺泡II型上皮细胞(AECII)较AECI数量多,体积小,胞质内含丰富的线粒体和溶酶体。在正常肺发育期间或当AECI损伤后^[22],AECII可作为AECI的祖细胞从而分化为AECI。并且,AECII可以调节肺泡间隔,合成、储存肺表面活性物质并将其释放到肺泡腔中,从而改善肺顺应性,防止肺泡萎陷^[23],以及调节代谢和免疫功能。作为开发肺泡芯片必不可少的细胞,这两种肺泡上皮细胞在体内都参与了气体交换并维持液体稳态^[24]。但原代细胞通常对压力十分敏感且不能在体外持续增殖,使得许多实验者应用肺部永生化细胞系代替肺泡上皮细胞来创建肺泡芯片。其中,A549细胞^[25]来源于人肺腺癌,因其形态及生化特征类似于人AECII,可作为常用的肺泡上皮细胞替代物。Frost等^[26]使用A549细胞和人脐静脉内皮细胞(HUVECs)在肺泡芯片中模拟呼吸膜,考察细胞旁和跨细胞分子转运浓度。然而,A549细胞作为肺泡芯片的上皮细胞不能形成连接紧密的细胞单层。另外,NCI H441细胞系在甲状腺转录因子-1(TTF-1)的表达、表面活性剂蛋白合成方面^[27]与人AECII有相似之处,许多实验者使用这种细胞来模拟呼吸膜。如Kasper等^[28]使用NCI H441和内皮细胞系(ISO-HAS-1)制成的体外肺泡模型检测了单分散无定形二氧化硅纳米颗粒介导的炎症和细胞毒性反应。然而,NCI H441细胞系虽能一定程度上代替肺泡上皮细胞,但缺乏人AECI表型,不能精准反应不同表型下的肺泡结构^[29]。表1中介绍了可能涉及的细胞及其构建肺泡芯片的优缺点。

实验者可根据实验需求与已有条件,选取合适的细胞类型,优化细胞的接种密度、气体流体压力与流速及涂层物质等实验条件构建仿生呼吸膜,大多数文献中都采用了人肺泡上皮原代细胞与内皮原



A: 气血屏障; B: “三明治结构”; C: 经典肺泡芯片图示^[10, 14]; D: 生物传感器式肺泡芯片^[35]; E: 配备主被动结合泵送系统的芯片装置^[32]

图1 肺泡芯片的构建模型

表1 肺泡上皮原代细胞与细胞系构建肺泡芯片的优缺点

原代细胞/细胞系	构建肺泡芯片的优势	构建肺泡芯片的不足	参考文献
AECI/AECII (原代)	构成肺泡上皮, 体外模拟肺泡的主要细胞	对压力敏感; 不能在体外增殖; 缺少一种细胞则构不成完整的肺泡	[20-21, 23]
A549	形态及生化特征类似于人AECI细胞	不能形成连接紧密的细胞单层; 缺乏AECII细胞表型	[26]
NCI H441	与AECII细胞和细支气管上皮细胞相似	缺乏人AECI细胞表型	[29]
R3/1	具有永久的AECI细胞形态和生理特性	缺乏AECII细胞表型, 存在种间差异	[30]
MLE-12	有与非纤毛细支气管和AECII细胞相似形态特征和基因表达模式, 能在流体剪切应力的刺激下分泌表面活性剂	在机械拉伸作用下, 表面活性剂的分泌受到限制	[31]

代细胞; Stucki 等^[32]在优化的微流体装置条件下培养了人肺泡上皮原代细胞和内皮细胞, 在有被动介质交换机制的条件下验证发现, AECII 和 AECI 细胞可以在芯片上培养数天, 克服了原代细胞因其脆弱性而导致损伤或应激的情况。

1.2 芯片装置及微流控设计

微流控肺泡芯片模拟了肺的呼吸膜结构, 并使其暴露于气液流动的物理机械力, 通过整合生物、化学因素, 一定程度上可使其像活体肺一样有节奏地进行呼吸运动。根据体内呼吸膜的基本结构, 如图 1B 所示, 肺泡芯片一般设计成一种三层的“夹心饼干”形式, 多孔膜上下两层通道分别可模拟肺泡和血管, 通过控制气体与流体的流速模拟呼吸气流和血流产生的压力与剪切应力^[33]。如图 1C 所示, Huh 等^[10]在 2010 年的 *Science* 杂志上就介绍了这

种经典的肺泡芯片, 通过将两个侧通道连接真空装置对多孔膜施加压力, 模拟人体吸气时胸膜内低于大气压的压力驱动拉伸, 释放真空模拟正常肺内呼气, 由此表示呼吸运动引起的呼吸膜动态机械变形, 再现了呼吸膜的关键结构和机械特性, 结果表明这种具有机械活性的肺泡芯片能够贴切地模拟肺部微环境。

Stucki 等^[34]应用生物感应驱动机制使模拟的呼吸膜暴露于三维周期性机械应变中, 体内呼吸导致的隔膜运动用薄膜周期性偏转模拟, 打破了人肺泡上皮原代细胞或其他细胞系的局限性, 揭示了机械应变对这些细胞的重要性。如图 1D 所示, Felder 等^[35]开发了一种生物传感器式肺泡芯片, 外部气动系统驱动该膜在类似于呼吸作用的动力下偏转, 以模拟呼吸的机械动力。如图 1E 所示, Stucki

等^[32]设计了一种配备主被动结合泵送系统的肺泡芯片,不仅能够施加周期性机械应力,而且能够在气液界面进行长期细胞培养,从而更贴切地模拟肺部微环境。

1.3 仿生疾病应用

使用肺泡芯片可以建立不同的肺疾病模型,如肺部炎症、肺损伤、肺纤维化和肺癌,可以精准模拟肺部病理环境。例如,Felder等^[35]在肺泡芯片上进行了伤口愈合试验,证实机械应力对伤口愈合的影响。Huh等^[14]使用白细胞介素-2(IL-2)在肺泡芯片中建立了肺水肿疾病模型,能有效地再现肺泡内液体积聚、纤维蛋白沉积和气体交换受损的情况。Asmani等^[36]基于微柱阵列的组合和微机械加工技术模拟生物外力作用,使用肺泡芯片模拟肺纤维化过程,如阶段性硬化、肺泡组织收缩及由于肺组织顺应性下降导致的支气管扩张等过程。此外,用肺泡芯片模拟高发病率、高死亡率的肺癌也越来越受到科研界的关注。

2 小气道芯片

肺是一个直接暴露在外部环境中的动态的器官,不断接受着各种各样的机械力量。有研究证明,机械应力在调节肺部的生理功能中起着重要的作用^[37]。呼吸道是人体抵御微生物、过敏原以及环境污染物的第一道防线,临床上,通常将下呼吸道中内径小于2 mm的小细支气管称为小气道^[38]。肺解剖学发现,气管和支气管管壁主要由黏膜、黏膜下层和外膜构成,随着支气管的向外延伸,管壁中的软骨片逐渐变小,直到直径为1 mm左右时,软骨不再存在,成为膜性结构,没有软骨支持,气体流速慢、阻力小、易阻塞,是肺部呼吸疾病的常见部位,如图2A所示为小气道模型横截面草图^[39]。体外构建的小气道芯片模拟了体内的呼吸作用以及气液界面,重现了体内小气道的生理环境,与肺泡芯片相比,小气道芯片主要应用于气道疾病^[40]。本章节将重点阐述小气道芯片如何还原小气道微环境,以及其中涉及的细胞类型、装置设计思路和相关疾病模型的构建方法。

2.1 原代细胞/细胞系

小气道上皮与肺泡的上皮细胞在组成、结构和生理功能上都有所不同^[38]。气道上皮黏膜层由促进黏液运动排出吸入性颗粒和病原体的纤毛细胞(纤毛数量变少)、分泌黏液的杯状细胞、分泌表面活性剂的基底细胞和肺神经内分泌细胞组成,由紧密

连接蛋白连接,形成连接紧密的物理屏障^[41-42]。

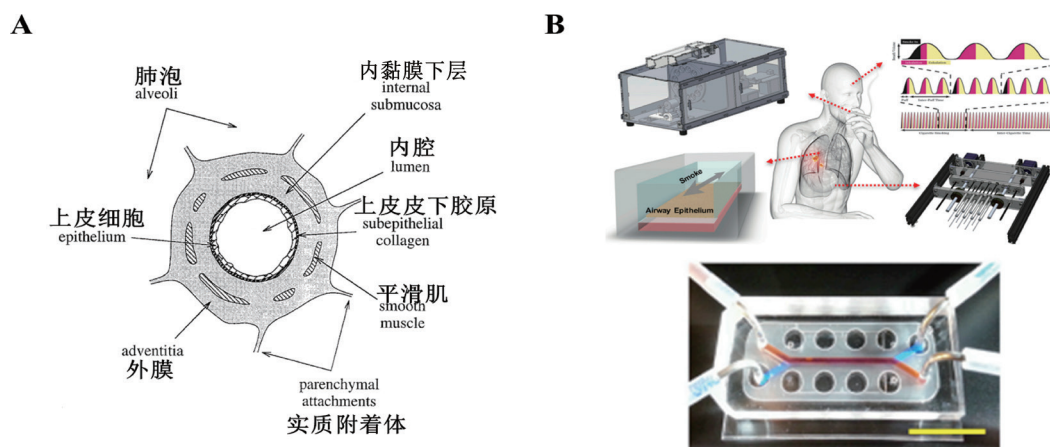
相比于肺泡芯片,小气道芯片研究较少,通常用气-液界面/上皮-血管相互作用模拟小气道的生理状态,一般使用人支气管上皮原代细胞、人支气管平滑肌原代细胞、人支气管上皮细胞系构建气道上皮,人肺微血管内皮细胞构建血管。大多数研究都使用人支气管上皮原代细胞,其在培养的过程中会出现与体内相似形态的柱状、假分层、黏液上皮层的完全分化,但分化消耗的时间较长,一般需要4~6周左右^[43-44]。也有使用人支气管上皮细胞系,如Calu-3细胞^[45]。另外,有研究者使用健康供体来源的人多能干细胞诱导成为功能化的多纤毛气道细胞作为气道芯片的细胞来源,来研究原发性纤毛运动障碍(primary ciliary dyskinesia, PCD)^[46]。值得一提的是,使用多功能干细胞诱导分化的肺细胞多用于类器官的形成,但由于其培养分化难度大、周期长,鲜少在芯片装置中使用。

2.2 芯片装置及微流控设计

小气道芯片建立的气液界面,实现了小气道上皮细胞的完全分化,并且在液体流道中加入免疫细胞也可阐明上皮细胞在免疫平衡中的重要作用。Benam团队对小气道芯片的创建有着重大的推动作用,他们设计的小气道芯片实现了气道上皮的完全分化,在高速显微镜下,可以观察到纤毛9~20 Hz的缓慢跳动,并且通过荧光聚苯乙烯微珠的加入可以观察到荧光沿着纤毛表面的快速运动^[44];如图2B所示,该芯片进一步与排烟机、微呼吸器、计算机控制系统集成,可模拟人类的吸烟行为^[47-48];进一步在气道微流控芯片的微血管通道中灌流中性粒细胞,可实时成像观察到微血管流道对流动状态的中性粒细胞的捕获,通过进一步量化分析说明正常和疾病状态下复杂和动态的炎症反应^[43]。肺表面活性剂分泌量减少,会使其降低气-液表面张力的能力受损,通常会导致气道内形成液塞,呼气过程中胸腔扩张,易使液塞破裂造成气道上皮损伤^[49]。Huh等^[37]设计的小气道芯片,通过连接自动化微流控装置,可动态地切换空气-液体两相流动,来模拟液塞传播及破裂而造成气道损伤的有害反应。

2.3 仿生疾病应用

小气道芯片可由完全分化的气道上皮细胞构建,通过外加物理机械力模拟正常或疾病状态下的生理、病理状态,是体外分析气道疾病的重要模型,如气道重塑以及表面活性剂障碍相关的肺部疾病,其中包括慢性阻塞性肺疾病(COPD)、哮喘等^[37]。



A: 小气道模型横截面草图^[39]; B: 小气道芯片及其烟雾发生装置^[47,4]

图2 小气道芯片的构建模型

COPD 是一种进行性肺部疾病, 吸烟及环境中的有害物质的吸入是其主要的致病因素, 其病理特征主要是外周气道炎症导致的不完全可逆的气流受限^[50]。由于细菌或病毒的致病性感染是其加重的重要原因, Benam 等^[44] 在小气道芯片上, 应用脂多糖 (LPS) 或病毒模拟物 (poly(I:C)) 刺激 COPD 患者来源的气道上皮细胞, 结果表明与正常气道上皮相比, 加重 COPD 的相关细胞因子白介素 -8 (IL-8) 和巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 明显升高; 研究者还通过集成烟雾系统使气道上皮暴露在烟雾中^[47-48], 模拟气道吸入烟雾的生物反应。

3 药物筛选

器官芯片除还原疾病的病理状态外, 还可用于药物的筛选。目前, 药物筛选通常使用二维的单细胞模型或动物模型, 然而单细胞难以还原器官组织复杂的三维结构; 动物模型与人体药物反应差异性大^[51], 使得大量的候选药物在 II 期和 III 期临床试验中因缺乏疗效或发生不良反应被停止开发^[52]。因此, 开发新的临床前药物筛选平台迫在眉睫^[53]。

微流控器官芯片以其高通量、自动化、实时多指标监测、准确模拟体内相关微环境等优点, 能够更快速、准确地预测药物的疗效和毒性, 有促进药物筛选发展的极大潜力^[54-55]。已有多种芯片用于药物筛选, 如 Biracsak 等^[56] 建立的高通量筛选肝脏毒性化合物的微流控肝芯片; Pauty 等^[57] 建立的微血管芯片能够有效地研究靶向特定因子 / 受体途径的抗血管生成药物; Ma 等^[58] 建立的骨芯片为筛选靶向成纤维细胞样滑膜细胞 (FLS) 迁移和侵袭介导的骨侵蚀药物提供了有力的工具; Blundell 等^[59] 建立

的胎盘屏障芯片能够用于检测药物是否可以通过胎盘屏障从而与胎儿接触, 为准确预测妊娠期药物安全性提供了新的技术手段; 以及多器官芯片平台, 如 Zheng 等^[60] 建立的多器官芯片, 有希望为缺氧诱导及癌症转移的多器官并发症药物筛选提供极大的便利。

目前, 也有较多的研究报道了如何应用肺芯片进行药物筛选。Yang 等^[61] 利用纳米静电纺丝技术制备聚乳酸 - 羟基乙酸共聚物作为超薄多孔膜, 在膜的两侧培养肺癌细胞、肺成纤维细胞和血管内皮细胞评估了抗肿瘤药物吉非替尼的抗肿瘤效果, 观察到了 A549 肺癌细胞如何突破了血管屏障, 导致内皮增生。Frost 等^[62] 建立的小气道芯片, 通过与喷射喷雾器连接, 完成化合物通过气道上皮 - 内皮屏障能力的筛选, 开发药物新型吸入疗法。Jain 等^[63] 在全血灌流的肺泡芯片中使用 LPS 感染上层人肺泡上皮原代细胞, 通过激活肺泡上皮细胞间接刺激下层三维血管中的内皮细胞, 导致肺血栓形成, 作为体外肺微血管血栓模型, 这种肺泡芯片可以快速筛选抗血栓药物。这些都使得器官芯片成为了具有较大潜力的药物筛选工具, 为其广泛使用提供科学依据。

4 讨论和展望

肺作为一个特殊的器官, 有着特定的细胞组成和独特的动态机械环境^[64]。随着微流体技术的发展, 研究人员不断设计出在体外能够更加准确还原体内肺结构及肺部微环境的新型微流体装置^[65]。目前, 集解剖学、物理学、材料科学和细胞生物学^[66-68] 为一体的肺芯片是模拟活体肺可靠的工具, 成功地复

制了人肺的精细结构,重现了肺部多细胞相互作用的复杂环境,整合了重要的呼吸功能,为探索正常肺部生理反应、肺部疾病的发病机理和药物筛选提供了强大的平台^[69-70]。

尽管器官芯片与其他体外模型相比有一些优势,但仍存在一定局限性。第一,芯片材料的选择,目前常用来制备培养装置的聚二甲基硅氧烷(PDMS)具有生物相容性、透明性、弹性等特性^[71],但它会吸收许多小分子疏水药物或荧光染料等物质^[72],影响实验结果的准确性,也常有PDMS与多孔膜键合不牢固的情况。第二,检测装置、灌流装置的接入和设计复杂,导致细胞染菌的风险升高;灌流过程易出现气泡,对细胞产生影响。第三,活体肺中其他类型细胞也发挥着必不可少的作用,但整合其他类型的多种细胞(巨噬细胞、淋巴细胞、树突细胞等免疫细胞)存在一定实验难度^[73-74]等,都会影响芯片的使用。

综上所述,本文全面介绍了肺芯片,包括肺泡芯片和小气道芯片的制备、应用及局限性。尽管微流控肺芯片技术相对较新,需要进一步改进与验证,但其仍对建立体外疾病模型以及进行快速有效的药物筛选有着深远影响,特别对于目前大流行的COVID-19来说,可以为治疗药物的开发提供强大的工具,在临床应用及商业制造等方面有远大的前景,为多种肺部疾病开发新的治疗策略。

[参 考 文 献]

- [1] Shieh AC. Biomechanical forces shape the tumor microenvironment. *Ann Biomed Eng*, 2011, 39: 1379-89
- [2] Schimek K, Frentzel S, Luettich K, et al. Human multi-organ chip co-culture of bronchial lung culture and liver spheroids for substance exposure studies. *Sci Rep*, 2020, 10: 7865
- [3] Shrestha J, Razavi Bazaz S, Aboulkheyr Es H, et al. Lung-on-a-chip: the future of respiratory disease models and pharmacological studies. *Crit Rev Biotechnol*, 2020, 40: 213-30
- [4] Li K, Yang X, Xue C, et al. Biomimetic human lung-on-a-chip for modeling disease investigation. *Biomicrofluidics*, 2019, 13: 031501
- [5] Bhatia SN, Ingber DE. Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 760-72
- [6] Knowlton S, Tasoglu S. A bioprinted liver-on-a-chip for drug screening applications. *Trends Biotechnol*, 2016, 34: 681-2
- [7] Bein A, Shin W, Jalili-Firoozinezhad S, et al. Microfluidic organ-on-a-chip models of human intestine. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2018, 5: 659-68
- [8] Sutterby E, Thurgood P, Baratchi S, et al. Microfluidic skin-on-a-chip models: toward biomimetic artificial skin. *Small*, 2020, 16: e2002515
- [9] Zhang F, Qu KY, Zhou B, et al. Design and fabrication of an integrated heart-on-a-chip platform for construction of cardiac tissue from human iPSC-derived cardiomyocytes and *in situ* evaluation of physiological function. *Biosens Bioelectron*, 2021, 179: 113080
- [10] Huh D, Matthews BD, Mammoto A, et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science*, 2010, 328: 1662-8
- [11] McCarthy M, Brown T, Alarcon A, et al. Fat-On-A-Chip models for research and discovery in obesity and its metabolic comorbidities. *Tissue Eng Part B Rev*, 2020, 26: 586-95
- [12] Hao S, Ha L, Cheng G, et al. A spontaneous 3D bone-on-a-chip for bone metastasis study of breast cancer cells. *Small*, 2018, 14: e1702787
- [13] Punde TH, Wu WH, Lien PC, et al. A biologically inspired lung-on-a-chip device for the study of protein-induced lung inflammation. *Integr Biol (Camb)*, 2015, 7: 162-9
- [14] Huh D, Leslie DC, Matthews BD, et al. A human disease model of drug toxicity-induced pulmonary edema in a lung-on-a-chip microdevice. *Sci Transl Med*, 2012, 4: 159ra147
- [15] Liu Q, Liu K, Cui G, et al. Lung regeneration by multipotent stem cells residing at the bronchioalveolar-duct junction. *Nat Genet*, 2019, 51: 728-38
- [16] Ochs M, Nyengaard JR, Jung A, et al. The number of alveoli in the human lung. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, 169: 120-4
- [17] Gillich A, Zhang F, Farmer CG, et al. Capillary cell-type specialization in the alveolus. *Nature*, 2020, 586: 785-9
- [18] Nova Z, Skovierova H, Calkovska A. Alveolar-capillary membrane-related pulmonary cells as a target in endotoxin-induced acute lung injury. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 831
- [19] Kumar Mahto S, Tenenbaum-Katan J, Sznitman J. Respiratory physiology on a chip. *Scientifica (Cairo)*, 2012, 2012: 364054
- [20] Weibel ER. On the tricks alveolar epithelial cells play to make a good lung. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 191: 504-13
- [21] Fehrenbach H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res*, 2001, 2: 33-46
- [22] Uhal BD. Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium. *Am J Physiol*, 1997, 272: L1031-45
- [23] Griese M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J*, 1999, 13: 1455-76
- [24] Matthay MA, Folkesson HG, Clerici C. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol Rev*, 2002, 82: 569-600
- [25] Foster KA, Oster CG, Mayer MM, et al. Characterization of the A549 cell line as a type ii pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp Cell Res*, 1998, 243: 359-66
- [26] Frost TS, Jiang L, Lynch RM, et al. Permeability of epithelial/endothelial barriers in transwells and

- microfluidic bilayer devices. *Micromachines* (Basel), 2019, 10: 533
- [27] Hermanns MI, Fuchs S, Bock M, et al. Primary human coculture model of alveolo-capillary unit to study mechanisms of injury to peripheral lung. *Cell Tissue Res*, 2009, 336: 91-105
- [28] Kasper J, Hermanns MI, Bantz C, et al. Inflammatory and cytotoxic responses of an alveolar-capillary coculture model to silica nanoparticles: comparison with conventional monocultures. *Part Fibre Toxicol*, 2011, 8: 6
- [29] Sung S, Park Y, Jo JR, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 in NCI-H292 human alveolar epithelial carcinoma cells: roles of p38 MAPK, ERK-1/2, and PI3K/PKB signaling proteins. *J Cell Biochem*, 2011, 112: 3015-24
- [30] Koslowski R, Barth K, Augstein A, et al. A new rat type I-like alveolar epithelial cell line R3/1: bleomycin effects on caveolin expression. *Histochem Cell Biol*, 2004, 121: 509-19
- [31] Mahto SK, Tenenbaum-Katan J, Greenblum A, et al. Microfluidic shear stress-regulated surfactant secretion in alveolar epithelial type II cells *in vitro*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 306: L672-83
- [32] Stucki JD, Hobi N, Galimov A, et al. Medium throughput breathing human primary cell alveolus-on-chip model. *Sci Rep*, 2018, 8: 14359
- [33] Bajaj P, Harris JF, Huang JH, et al. Advances and challenges in recapitulating human pulmonary systems: at the cusp of biology and materials. *ACS Biomater Sci Eng*, 2016, 2: 473-88
- [34] Stucki AO, Stucki JD, Hall SR, et al. A lung-on-a-chip array with an integrated bio-inspired respiration mechanism. *Lab Chip*, 2015, 15:1302-10
- [35] Felder M, Trueeb B, Stucki AO, et al. Impaired wound healing of alveolar lung epithelial cells in a breathing lung-on-a-chip. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 3
- [36] Asmani M, Velumani S, Li Y, et al. Fibrotic microtissue array to predict anti-fibrosis drug efficacy. *Nat Commun*, 2018, 9: 2066
- [37] Huh D, Fujioka H, Tung YC, et al. Acoustically detectable cellular-level lung injury induced by fluid mechanical stresses in microfluidic airway systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104:18886-91
- [38] Invernizzi R, Lloyd CM, Molyneaux PL. Respiratory microbiome and epithelial interactions shape immunity in the lungs. *Immunology*, 2020, 160: 171-82
- [39] Kamm RD. Airway wall mechanics. *Annu Rev Biomed Eng*, 1999, 1: 47-72
- [40] Elias-Kirma S, Artzy-Schnirman A, Das P, et al. *In situ*-like aerosol inhalation exposure for cytotoxicity assessment using airway-on-chips platforms. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 91
- [41] Hiemstra PS, McCray PB, Bals R. The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *Eur Respir J*, 2015, 45: 1150-62
- [42] Paschini M, Kim CF. An airway organoid is forever. *EMBO J*, 2019, 38: e101526
- [43] Benam KH, Mazur M, Choe Y, et al. Human lung small airway-on-a-chip protocol. *Methods Mol Biol*, 2017, 1612: 345-65
- [44] Benam KH, Villenave R, Lucchesi C, et al. Small airway-on-a-chip enables analysis of human lung inflammation and drug responses *in vitro*. *Nat Methods*, 2016, 13: 151-7
- [45] Humayun M, Chow CW, Young EWK. Microfluidic lung airway-on-a-chip with arrayable suspended gels for studying epithelial and smooth muscle cell interactions. *Lab Chip*, 2018, 18: 1298-309
- [46] Sone N, Konishi S, Igura K, et al. Multicellular modeling of ciliopathy by combining iPS cells and microfluidic airway-on-a-chip technology. *Sci Transl Med*, 2021, 13: eabb1298
- [47] Benam KH, Novak R, Nawroth J, et al. Matched-comparative modeling of normal and diseased human airway responses using a microengineered breathing lung chip. *Cell Syst*, 2016, 3: 456-66. e454
- [48] Benam KH, Novak R, Ferrante TC, et al. Biomimetic smoking robot for *in vitro* inhalation exposure compatible with microfluidic organ chips. *Nat Protoc*, 2020, 15: 183-206
- [49] Grotberg JB. Respiratory fluid mechanics and transport processes. *Annu Rev Biomed Eng*, 2001, 3: 421-57
- [50] Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138: 16-27
- [51] Phan DTT, Wang X, Craver BM, et al. A vascularized and perfused organ-on-a-chip platform for large-scale drug screening applications. *Lab Chip*, 2017, 17: 511-20
- [52] Arrowsmith J, Miller P. Trial watch: phase II and phase III attrition rates 2011-2012. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12: 569
- [53] Mittal R, Woo FW, Castro CS, et al. Organ-on-chip models: implications in drug discovery and clinical applications. *J Cell Physiol*, 2019, 234: 8352-80
- [54] Azizgolshani H, Coppeta JR, Vedula EM, et al. High-throughput organ-on-chip platform with integrated programmable fluid flow and real-time sensing for complex tissue models in drug development workflows. *Lab Chip*, 2021, 21: 1454-74
- [55] Han Q, Bing W, Di Y, et al. Kinsenoside screening with a microfluidic chip attenuates gouty arthritis through inactivating NF- κ B signaling in macrophages and protecting endothelial cells. *Cell Death Dis*, 2016, 7: e2350
- [56] Bircsak KM, DeBiasio R, Miedel M, et al. A 3D microfluidic liver model for high throughput compound toxicity screening in the OrganoPlate(R). *Toxicology*, 2021, 450: 152667
- [57] Pauty J, Usuba R, Cheng IG, et al. A vascular endothelial growth factor-dependent sprouting angiogenesis assay based on an *in vitro* human blood vessel model for the study of anti-angiogenic drugs. *EBioMedicine*, 2018, 27: 225-36
- [58] Ma HP, Deng X, Chen DY, et al. A microfluidic chip-based co-culture of fibroblast-like synoviocytes with

- osteoblasts and osteoclasts to test bone erosion and drug evaluation. *R Soc Open Sci*, 2018, 5: 180528
- [59] Blundell C, Yi YS, Ma L, et al. Placental drug transport-on-a-chip: a microengineered *in vitro* model of transporter-mediated drug efflux in the human placental barrier. *Adv Healthc Mater*, 2018, 7: 10
- [60] Zheng L, Wang B, Sun Y, et al. An oxygen-concentration-controllable multiorgan microfluidic platform for studying hypoxia-induced lung cancer-liver metastasis and screening drugs. *ACS Sens*, 2021, 6: 823-32
- [61] Yang X, Li K, Zhang X, et al. Nanofiber membrane supported lung-on-a-chip microdevice for anti-cancer drug testing. *Lab Chip*, 2018, 18: 486-95
- [62] Frost TS, Jiang L, Zohar Y. Pharmacokinetic analysis of epithelial/endothelial cell barriers in microfluidic bilayer devices with an air-liquid interface. *Micromachines (Basel)*, 2020, 11: 536
- [63] Jain A, Barrile R, van der Meer AD, et al. Primary human lung alveolus-on-a-chip model of intravascular thrombosis for assessment of therapeutics. *Clin Pharmacol Ther*, 2018, 103: 332-40
- [64] Fredberg JJ, Kamm RD. Stress transmission in the lung: pathways from organ to molecule. *Annu Rev Physiol*, 2006, 68: 507-41
- [65] Huh D, Torisawa YS, Hamilton GA, et al. Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips. *Lab Chip*, 2012, 12: 2156-64
- [66] Zhang C, Zhao Z, Abdul Rahim NA, et al. Towards a human-on-chip: culturing multiple cell types on a chip with compartmentalized microenvironments. *Lab Chip*, 2009, 9: 3185-92
- [67] Luni C, Serena E, Elvassore N. Human-on-chip for therapy development and fundamental science. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 25: 45-50
- [68] Li K, Yang X, Gao X. Probing tumor microtissue formation and epithelial-mesenchymal transition on a well-mesh microchip. *Biomicrofluidics*, 2019, 13: 014102
- [69] Sakolish CM, Esch MB, Hickman JJ, et al. Modeling barrier tissues *in vitro*: methods, achievements, and challenges. *EBioMedicine*, 2016, 5: 30-9
- [70] Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology *in vitro*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7: 211-24
- [71] Quake SR, Scherer A. From micro- to nanofabrication with soft materials. *Science*, 2000, 290: 1536-40
- [72] Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol*, 2011, 21: 745-54
- [73] Seo J, Conegliano D, Farrell M, et al. A microengineered model of RBC transfusion-induced pulmonary vascular injury. *Sci Rep*, 2017, 7: 3413
- [74] Huh D, Kim HJ, Fraser JP, et al. Microfabrication of human organs-on-chips. *Nat Protoc*, 2013, 8: 2135-57