



基于微流控技术的类器官芯片在肺癌精准治疗中的应用

曾潇¹, 马琼¹, 李雪珂¹, 由丽婷², 李佳¹, 付西¹, 任益锋¹, 由凤鸣^{1,3*}

1. 成都中医药大学附属医院, 成都 610072;

2. 四川大学华西医院检验科, 成都 610041;

3. 成都中医药大学肿瘤研究所, 成都 610072

* 联系人, E-mail: yfmdoc@163.com

2022-10-15 收稿, 2022-12-04 修回, 2022-12-05 接受, 2022-12-06 网络版发表

四川省科技厅重大科技专项(2022ZDZX0022)和成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划(XKTD2022004)资助

摘要 肺癌是全球范围内发病率和死亡率均居首位的恶性肿瘤, 具有显著的个体化特征和遗传异质性. 无疑, 以患者为中心的个性化药物筛选和新药研发对提高总体生存率至关重要. 近年来, 由于类器官模型具有培养周期短、操作便捷和拟合度高等优势, 能够真实保留患者肿瘤的遗传信息, 在模型构建和个性化药物筛选中扮演着越来越重要的角色. 然而, 传统类器官稳定性差、肿瘤微环境单一、通量低等固有缺陷限制了其进一步的临床转化与应用. 基于微流控技术的类器官芯片是类器官在生物技术维度的延伸, 可以实现对理化环境因素的精准控制、高度模拟肿瘤微环境、显著提高药物筛选通量, 有效弥补了传统类器官培养技术的不足, 开启了肿瘤个体化治疗新纪元. 本文总结了微流控类器官芯片作为个性化药物筛选模型的优势特征, 并结合在肺癌研究中的最新进展, 探讨了类器官芯片在肺癌精准治疗中的转化价值和未来的发展方向.

关键词 肺癌, 患者源性类器官, 药物筛选, 微流控, 类器官芯片

近10年来, 靶向疗法和免疫疗法在肺癌精准治疗中取得了重大成就, 有效改善了客观缓解率和疾病控制率, 显著延长了患者的总生存期和无疾病进展生存期^[1-3]. 然而, 由于不同患者遗传背景差异大、肿瘤组织本身固有的表型和遗传高度异质性, 以及现有的医疗水平难以阐明肿瘤发生的内在原因并做到个体化治疗, 故而“一刀切”的治疗方式往往收效甚微^[4,5], 肺癌患者的5年生存率仍不足20%. 基于以上临床问题, 寻找良好的临床前模型、开展个体化的药物筛选与新药研发, 对实现肺癌精准治疗具有重要意义. 随着体外三维培养技术的发展, 患者来源的类器官(patients-derived organoids, PDOs)能够真实保留原始肿瘤的遗传异质性, 在疾病模型的构建与药物筛选方面发挥着日趋重要的作用. 然而, PDOs的传统培养方式在技术层面仍存在

一些瓶颈: (1) 重复性差, PDOs在活性、大小和形状等方面存在很大的差异, 无法确保实验结果的准确性; (2) 通量低, PDOs的样本量较小, 难以进行药物的高通量筛选; (3) 组织模拟性不足, 缺少血管细胞、肿瘤浸润免疫细胞的共培养体系, 限制了PDOs在抗血管化及免疫治疗药物筛选方面的应用^[6-9]. 因此, 如何改善和优化PDOs模型对类器官的进一步临床转化与应用至关重要.

类器官芯片(organoids-on-a-chip)是类器官在生物技术维度的延伸, 可以有效弥补传统类器官培养技术的不足^[8,10]. 具体而言, 它是以微流控芯片技术为核心, 在微环境水平上通过控制流体灌注、牵张力和化学梯度, 促进类器官结构更仿生和功能成熟, 具有可控化、高通量和动态持续监测等优势, 为实现PDOs培养的规

引用格式: 曾潇, 马琼, 李雪珂, 等. 基于微流控技术的类器官芯片在肺癌精准治疗中的应用. 科学通报, 2023, 68: 1666–1676

Zeng X, Ma Q, Li X K, et al. Application of organoids-on-a-chip based on microfluidic technology in precision medicine of lung cancer (in Chinese). Chin Sci Bull, 2023, 68: 1666–1676, doi: [10.1360/TB-2022-1027](https://doi.org/10.1360/TB-2022-1027)

模化和自动标准化提供了可能, 对提高类器官模型构建的成功率、药物筛选的准确性和扩大类器官的应用范围具有重要意义^[11~13]。因此, 本文总结基于微流控技术的类器官芯片作为个性化药物筛选模型的优势特征, 并结合在肺癌研究中的最新进展, 探讨类器官芯片在肺癌精准治疗中的转化价值和未来的发展方向(图1)。

1 基于微流控技术的类器官芯片临床前模型具有显著优势

高度模拟体内肿瘤环境和药物反应、高效的筛选方式和精确的数据分析是药物筛选结果快速实现临床转化的关键^[14]。类器官芯片作为药物筛选的良好载体能更加真实地模拟体内微环境特征, 特别是其强大的集成能力, 使得包括建模、药物反应、检测等实验流程都能够汇集到微流控系统中完成^[15]。接下来, 本文以微流控类器官芯片为切入点, 总结其作为临床前模型、开展个性化药物筛选和新药研发的优势特征。

1.1 提高类器官的稳定性

由于传统类器官培养技术存在对细胞密度的控制不稳定、缺乏物理流动条件等因素, 培养成功率仅在20%~95%之间, 并导致PDOs在大小、形态及数量上均存在一定差异^[16~18]。例如, Kim等人^[19]构建的85例肺癌PDOs, 成功率仅为50%。尽管可以通过优化培养基成分来改善PDOs生长环境, 但仍然存在形态多样、活力不稳定等问题, 导致难以准确地量化药物反应。

显然, 微流控技术的出现提高了PDOs模型的一致性和稳定性。已有研究证实, 微流控技术可以利用微通道处理或操纵微小流体, 这些微流体通过调节剪应力、间质流体流动和细胞密度而产生多种自分泌或旁分泌的细胞因子, 形成不同的基质特性。这些基质特性对类器官的形态、生长速度和代谢活动等生理状况具有潜在的影响^[20,21]。值得一提的是, 在保留亲代肿瘤遗传特性的情况下, 类器官芯片能够为PDOs提供稳定的营养浓度或氧气, 增加细胞活性和均一性^[20]。例如, Diana团队^[22]通过广泛应用的微铣削机械加工工艺, 制备

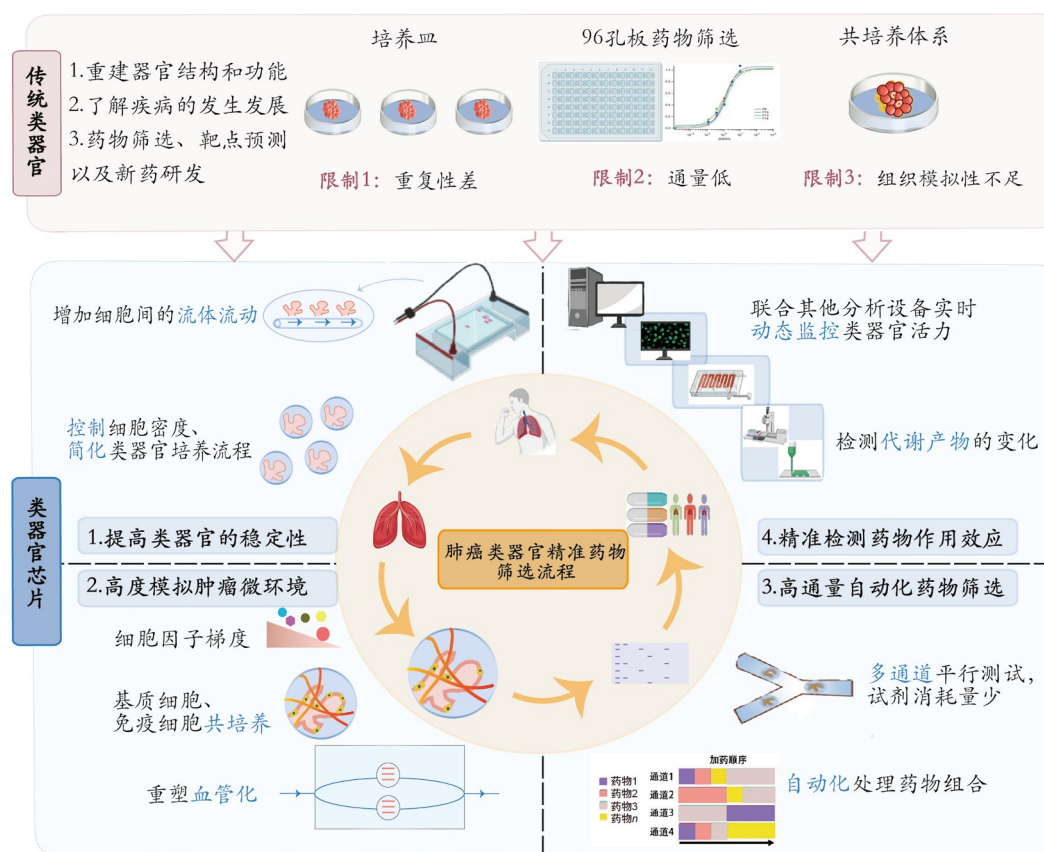


图1 基于微流控技术的类器官芯片在精准治疗中的优势特点

Figure 1 Advantages and characteristics of organoids-on-a-chip based on microfluidic technology in precision medicine

了一种成本低、快速成型的微流控芯片(图2(a)). 该装置通过连接注射泵控制通道中的流体流动, 产生可控、量化的细胞密度梯度, 验证了在连续流动和适宜细胞密度条件下, 类器官的大小更均一, 增殖活性也更高. 为了更好地将类器官模型用于临床前药物筛选, 研究者还仔细观察了离心、冷冻等过程对PDOs稳定性的影响, 发现这些常规步骤可能会引起细胞差异并降低其对药物的敏感性^[18,23]. 最近, Liu等人^[23]设计出了一款超疏水微孔阵列类器官芯片用于PDOs的原位冻存传代, 该设计消除了慢速冷冻对PDOs的伤害, 省略了离心和重悬步骤, 最大限度减少了对PDOs的耗损, 以保存类器官活力, 并证明了抗癌药物敏感性没有发生改变, 具有复现性和精准性.

1.2 高度模拟肿瘤微环境

肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)是直接影响药物反应预测准确性的重要因素, 已经成为肺癌化疗、免疫疗法等药物研发的研究前沿与热点^[24,25]. 大多数PDOs模型只有肿瘤细胞, 而免疫细胞、基质细胞、细胞因子等关键的微环境因素在培养过程中会丢失, 这无疑限制了PDOs在化疗和靶向药物筛选中的功能测试. 尽管已有与免疫细胞共培养的TME类器官重建模型^[26~28], 但仍存在难以扩增、无法完整地表征TME等缺陷.

与静态的共培养体系相比, 微流控技术能在纳米尺度上精确控制设备中的物理和化学参数, 重塑TME的理化特性, 模拟TME中细胞间的复杂互作关系^[12,13]. 因此, 类器官芯片共培养患者来源的肿瘤细胞与免疫细胞能克服传统PDOs功能测试的限制. Kitajima等人^[29]成功地向培养基中加入拟研究的外源免疫细胞亚群, 如T细胞(Jurkat细胞), 用于探究肿瘤细胞与Jurkat T细胞募集缺陷之间的直接关系, 对揭示疾病的潜在机制和研发新药具有重要的指导价值. 不仅如此, Poletti等人^[30]研制的微流体装置可用于PDOs与宿主特异性分离的复杂细菌群落相结合, 这种培养模式保留了亲代TME成分, 并通过灌注方式定时递送新鲜的营养物质和去除从培养腔脱落的坏死细胞, 延长了类器官的寿命, 可在一定程度上实现“宿主细胞-微生物”相互作用的模型构建, 促进了基于微生物组疗法的发展. 另外, 芯片内形成的低氧、低营养等体内TME所特有的理化环境可导致肿瘤细胞随之发生基因表达谱的改变, 且这种改变与临床患者基因表达变化一致, 表明该微

流控芯片高度再现了体内TME的结构与功能. 例如, Kim等人^[31]设计的7个微流体通道以共培养3种类型细胞: 脑上皮细胞、星形胶质细胞、NSCLC脑转移细胞构建脑肿瘤微环境(brain tumor microenvironment, bTME), 进一步阐明脑转移性非小细胞肺癌细胞与bTME之间潜在的互作关系(图2(b)). 在此基础上, 类器官芯片还可以外源性建立血管膜层, 增强组织免疫细胞-血管相互作用, 在体外高度重现肿瘤血管生成微环境及细胞之间相互作用的动态过程, 有利于研究相关分子机制和药物分析^[32,33].

1.3 动态监测药物反应

在药物疗效评估方面, 传统方式通常先对PDOs进行染色, 再通过荧光显微镜来判别细胞活性和状态^[34]. 这种方法不仅操作复杂、影响后续试验, 而且很难做到对类器官进行动态实时监测.

微流控技术起源于集成电路芯片的制作, 由此引入传感器可以无介入、无破坏性、动态持续地监测类器官对药物的反应^[35]. 例如, 微流控芯片与高分辨率成像系统结合能实现对类器官活性和数量的动态检测. Schuster等人^[36]将微流控芯片与电传感器相耦合, 建立了一种实时药效评价的集成微流控芯片, 该芯片通过检测凝胶和类器官总体的阻抗, 能够快速、精确地反映肿瘤在化疗药物作用后的阻抗值变化, 进而判断肿瘤细胞对不同药物的反应(图2(c)). 与常规药物分析相比, 该芯片在12 h内即可迅速分辨出对药物敏感的细胞和耐药细胞. 吴谦^[37]、施洋峰等人^[38]也做了类似的研究. 例如, 施洋峰等人^[38]介绍了一种基于传感器和三维细胞及类器官芯片的多参数药物检测诊断方法. 通过多通道的微纳传感器将细胞接种到传感器表层, 以达到对细胞实时状态进行监测的目的. 在此基础上, 深度学习和微流控芯片的跨尺度融合以更高效、更准确的方式捕捉数据的固有特征, 实现对细胞识别、定位、跟踪和图像分割, 是进一步研究肿瘤微环境细胞-细胞之间相互作用以及对药物治疗反应的强大监测手段^[39].

单纯通过成像监控细胞的增殖与凋亡, 对类器官芯片最重要的应用——个性化药物筛选来说显然不够全面. 如对于作用于肿瘤细胞或微环境的药物, 我们需要认识肿瘤细胞的不同亚型或者寻找新的生物标志物, 筛选出对某一治疗敏感的人群, 从而针对该人群精准用药. 因此, 类器官培养微环境中各种离子和蛋白大分

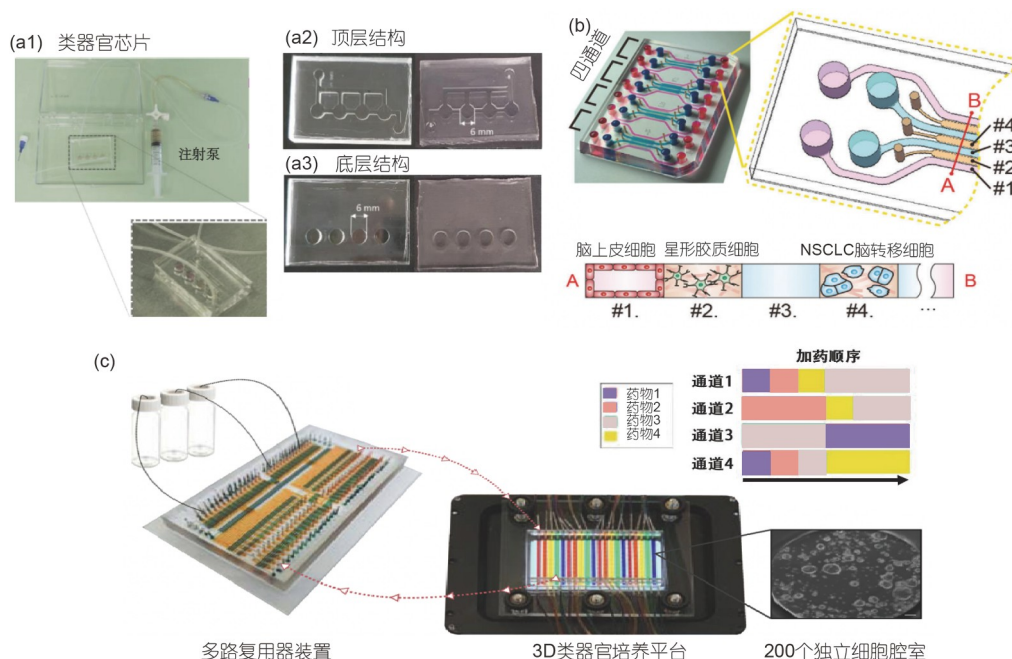


图2 类器官芯片的设计与制造。(a1) 连接注射泵控制通道流体流动的微流控芯片装置实物图。(a2) 顶层包括一个分布在4个小通道中的入口通道和1个出口。(a3) 底层由4个直径为6 mm的圆孔组成, 用于培养类器官。(a2), (a3) 从左至右分别由聚甲基丙烯酸甲酯(polymethyl methacrylate, PMMA)、聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)材料制作^[22]。(b) 包括7个通道的微流体装置示意图及3种类型细胞共培养(脑上皮细胞、星形胶质细胞、NSCLC脑转移细胞)的横截面图^[31]。(c) 用于自动动态检测的类器官培养微流控平台。基于可控制的微流控芯片(多路复用器装置)为200个独立3D培养腔室提供自动化平行通道, 可进行不同浓度的多种药物组合和实时药效评价, 以便实现类器官药物筛选的高通量、规模化、自动化^[36]

Figure 2 Design and fabrication of organoids-on-a-chip devices. (a1) Organoids-on-a-chip setup for the injection pump which controls fluid flow in the channels. (a2) The top layer includes one inlet channel distributed in four small channels and one outlet. (a3) The bottom layer consists of four round wells of 6 mm in diameter for organoids' seeding and growing. (a2), (a3) From left to right, it is made of polymethyl methacrylate (PMMA) and polydimethylsiloxane (PDMS) respectively^[22]. (b) Schematic of microfluidic device with seven channels and the cross section figure of three types of cells co-culture (brain metastases from epithelial cells, astrocytes, NSCLC cells)^[31]. (c) A microfluidic platform for organoid culture with automatic dynamic detection. The microfluidic chip (multiplexer device) provides an automated parallel channel for 200 independent 3D culture chambers, enabling multi-drug combinations of different concentrations and real-time efficacy evaluation, in order to achieve high throughput, scale, and automation of organoid drug screening^[36]

子标志物的含量也是药物筛选中重要的指标。基于微流控技术的类器官有望实现多参数的动态检测, 可以更全面和精确地评估药物疗效或毒性。例如, 通过连接光寻址电位传感器或使用荧光探针, 可以在不干扰类器官培养过程的情形下实现对蛋白质大分子、mRNA、pH、电化学变化等多种参数的高灵敏度连续观察^[40,41]。这种技术的便捷实时性与精确可靠性加速了医疗科研的进程。

1.4 实现高通量药物筛选

通过外科手术或小样本活检获得的组织十分有限, 如何为高通量药物筛选提供足够的细胞来源, 是类器官应用于临床前药物筛选或个性化治疗的重要挑战之一^[36]。此外, 传统类器官培养体系人工操作繁杂、难以模拟临床上最常见的周期性用药方案, 现阶段仍困囿

于如何实现自动化、高通量药物筛选。

与传统的多孔板相比, 芯片上纳米级的培养容量和多通道并行的设计大幅度降低了PDOs培养的数量要求, 可在微管道或微培养腔中快速反应, 且试剂消耗量少、人工操作简单, 极大地降低了成本^[36]。Au等人^[42]研发了基于微流控技术的类器官药物筛选平台, 该平台可以控制单个细胞凝胶团的运动, 实现对单个类器官的检测, 既能降低类器官的培养用量, 又可提高实验通量, 克服了临床样本量少的关键问题。与需要大量手动药物递送的传统类器官培养方法相比, 采用机械自动化的类器官芯片, 可以减少耗时、费力的移液步骤, 尽可能避免人为错误, 降低失败率^[36]。该装置还能轻松组合不同浓度的多种药物, 实现大规模、多药物处理以及识别潜在药物组合等一系列功能。例如, Zhai等人^[43]发明了一种用于运送药量的液滴喷射装置,

在一张芯片上设计了数百个细胞微通道,微通道内接种不同密度的肿瘤细胞,通过芯片上药物自动分配产生跨越3~4个数量级的药物浓度,根据药物筛选需求,可向芯片内注入不同类型和浓度的化疗药物,极大简化了早期繁复的药物筛选过程,同时提高了药物研发的效率。

2 类器官芯片在肺癌精准治疗中的研究进展

类器官芯片提高了类器官相关实验结果的可信度,研究者正致力于利用类器官芯片来加速推进肺癌精准治疗的发展。现将该领域的主要研究进展概述如下^[6,23,31,37,44~50](表1)。

2.1 在肺癌个性化药物筛选中的应用

有研究利用手术切除的肺癌组织在已成功构建的类器官芯片上进行了PDOs的全基因序列分析^[23,31,45],结果显示,肺癌PDOs与标本切片之间有90%的体细胞变异是一致的,这为肺癌的个体化治疗提供了依据。Huh团队^[6]研制了一种基于肺癌PDOs的超疏水微孔阵列芯片,可以在极短时间内产生数百个类器官并进行高通量化疗药物的药敏测试。值得注意的是,这是首次真正做到了在1周内将肺癌PDOs引入芯片后进行不同浓度的高通量筛选,缩短了类器官培养和药物测试的时间,解决了精准诊疗的一大难题,极大地加快了类器官应用的临床转化效率。类似地,Jung等人^[49]研发了一站式微流控系统,不仅通过持续流动的含药培养基向肺癌PDOs输送营养和氧气,还可进行动态药敏试验,在经顺铂和依托泊苷诱导后,肺癌PDOs外周区域的细胞发生死亡,而核心区域的细胞仍可继续存活7 h,证明了PDOs的核心区域含有化疗耐药细胞,表明利用该系统可更好地预测肺癌的药物反应和选择最佳治疗方案。Tan等人^[44]则采用先进的3D打印技术制备PDMS肺癌类器官芯片,该芯片不仅能够有序地进行单个或组合的药物筛选,还能实时动态地监测药物反应指标。最近,有学者已能够针对类器官进行自动的结构消化^[51],面向单细胞层面进行多层次异质性分析解读,在芯片上实现单细胞分布与建库,继而基于测序数据分析来实现药物响应差异分群以及单细胞类型分型。

2.2 探究肺癌TME中的复杂相互作用

为了真实模拟肿瘤给药的局部微环境,研究者利用肺癌细胞与成纤维细胞按体内空间排布特征分别接

种至相应的微通道中,构建类器官芯片共培养体系,以捕获肿瘤细胞群和基质成分的相互作用。该研究发现,成纤维细胞逐渐形成集群并促进了肿瘤细胞的增殖。在此基础上,证实了肿瘤细胞和成纤维细胞共培养对吉非替尼和顺铂药物敏感性降低^[52]。同样地,Kitajima等人^[29]、Hassell等人^[47]也进行了类似的实验。例如,通过将Jurkat细胞添加到介质通道中,进一步研究其浸润到癌症球体过程中与肿瘤细胞之间的相互作用和串扰,揭示了PD-1抑制剂治疗原发性耐药机制与肿瘤微环境周围的T细胞耗竭密切相关^[29]。结果表明,该芯片不仅成功模拟了体内免疫TME,还有助于发现TME中肿瘤生长和侵袭的关键性调控因子,以便开展相应的药物研究。在研究肿瘤微环境血管化方面,Paek等人^[48]重现了人肺腺癌3D类器官血管化,该芯片装置将肺腺癌细胞和内皮细胞分别接种于有顶部开口的细胞培养室和用于控制血管灌注的两个平行微通道中,以研究微环境中结构多变的微血管,评价紫杉醇的血管内递送特性,发现了在脉管系统协助下,类器官中心凋亡细胞增多,平均血管直径、长度和密度减少。此外,针对抗肿瘤转移也是靶向TME的难点和研究热点,微流控技术已成为构建肺癌转移模型的一种新手段,其主要研究内容有单细胞分析、内皮细胞迁移、新生血管生成等^[53]。例如,研究者设计了一种简单的模拟肺癌侵袭微环境、细胞与细胞/基质之间相互作用的微流体芯片,该装置中培养的肺癌细胞形成三维球体,并表现出上皮-间质转化(E-cadherin、N-cadherin、Snail1和Snail2的表达改变),进一步用于评估侵入远处器官(大脑、骨骼、肝脏)的可能性^[50]。因此,通过类器官芯片在体外再现TME中肿瘤-间质细胞相互作用、血管生成、肿瘤转移的动态过程,有利于研究相关分子机制和药物分析,进一步推进肺癌的精准治疗。

2.3 基于肿瘤循环细胞(CTCs)构建类器官模型

循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是液体活检的生物标志物之一,是一种从实体肿瘤脱落并侵入外周血循环中的肿瘤细胞,因其取样便捷、创伤性小,在早期诊断、预测肿瘤发展及指导个体化治疗中具有重要作用^[48,54]。但由于外周血中CTCs的浓度低于其他血细胞,两者比例约为1:10⁹^[55],目前常用的液体组织学检查手段(如密度梯度离心法、过滤法、免疫磁性分选法)难以对极少数目的CTCs实现有效的体外扩增,导致临床应用受限^[56,57]。近年来,基于微流控

表 1 类器官芯片模型在肺癌精准治疗中的研究进展

Table 1 Research progress of organoids-on-a-chip model in precision medicine of lung cancer

样本来源	微流控芯片特点 (结构、材料及工艺)	应用	文献
手术切除组织	3个培养腔室和4个培养基通道构成1个微流体单元, 共4个单元	构建脑肿瘤微环境(bTME)以阐明脑转移性非小细胞肺癌细胞与bTME之间潜在的微妙互作关系; 临床靶向BM药物的敏感性测试(阿法替尼、PKI587、色瑞替尼和曲美替尼等)	[31]
手术切除组织	3D打印技术制备PDMS肺类器官芯片	临床EGFR靶向药物(吉非替尼、阿法替尼和奥希替尼)	[44]
手术切除组织/活检组织	含TiO ₂ 纳米颗粒的超疏水微孔阵列(SMAR-chip)	临床靶向/化疗药物的敏感性测试(酪氨酸激酶抑制剂、紫杉醇和顺铂等)	[6]
手术切除组织	含TiO ₂ 纳米颗粒的超疏水微孔阵列(SMAR-chip) 玻璃化冷冻试剂盒	PDOs的原位冻存与解冻; 化疗药物敏感性测试(吉西他滨、培美曲塞或多柔比星等)	[23]
手术切除组织	多孔结构通道, 聚碳酸酯优化填充	临床化疗药物的敏感性测试(吉西他滨和顺铂)	[45]
活检组织、胸水	一站式集成化微流控	检测类器官状态(均匀生长); 临床化疗药物的敏感性测试(顺铂和依托泊苷)	[49]
患者血液样本	基于3D共培养的微流控芯片	分选和扩增早期肺癌患者血液来源的循环肿瘤细胞; 可进行基因、蛋白功能层面分析, 具有发现新生物标志物的潜力	[46]
肺癌细胞系(A549、H1299、H460)	基于3D球体的电阻抗传感器药物筛选系统	实时反映细胞的贴附、死亡和形态变化; 临床化疗药物的敏感性测试(依托泊苷和培美曲塞)	[37]
肺腺癌细胞(H1975)	上通道多孔micro-ECM涂层培养肺癌细胞 下通道四壁培养血管内皮细胞	模拟EGFR突变肺癌细胞发展与侵袭; 临床靶向药物的敏感性测试(酪氨酸激酶抑制剂)	[47]
肺腺癌细胞(A549)	顶部开口的3D细胞培养腔和2个用于控制血管灌流的平行微通道	自组装和可灌流的微血管网络; 临床化疗药物的血管毒性测试	[48]
肺腺癌细胞(A549)	多器官微流控芯片(上游腔室模拟肺; 下游腔室模拟脑、骨、肝)	构建肺癌转移模型并进行体内验证	[50]

芯片的CTCs分选技术由于显著提高了CTCs的分选通量, 同时增加了检测敏感性与特异性而受到广泛关注^[58]. Zhang等人^[46]利用19名早期肺癌患者全血, 经过微流控芯片中捕获CTCs, 成功构建了与成纤维细胞共培养类器官芯片模型(成功率为73%). 该模型通过对芯片基底表面进行分子修饰, 确定了识别分子与细胞靶标分子间高特异性亲和关系, 从而获得了CTCs的有效分离, 并能够在14 d内完成CTCs的体外扩增, 用于基因、蛋白及功能等各个层面的分析, 对肿瘤精准医疗具有重要的临床意义. 该富集CTCs的方法也广泛用于其他种类的肿瘤, 包括结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、肝癌等^[58,59], 一站式解决了CTCs的分选和扩增培养问题. 在此基础上, 还可以利用CTCs进行动物模型构建、耐药性和药物敏感性分析. 例如, 有研究探索了将小细胞肺癌患者全血分离的CTCs进行体外扩增培养后移植至裸鼠体内, 生成与个体患者肿瘤相匹配的动物临床前模型, 观察其对顺铂和依托泊苷的反应^[60].

总之, 借助微流控技术在控制和处理微量液体及细胞方面的独特优势, 不仅改善了类器官培养的肿瘤

微环境, 并实现了后续高通量、自动化的药敏实验, 为肺癌个体化诊疗创造了新机会.

3 类器官芯片在肺癌精准治疗中的应用前景与展望

如今, 类器官芯片的应用在一定程度上为肺癌的精准治疗指明了方向, 使得肿瘤的基础研究结果转化为有效的临床治疗方案这一困境出现了转机. 然而, 要实现肺癌患者治疗过程的个性化全程管理, 仍需开展大量研究以进一步明确肺癌发生与发展过程中的分子特征以及潜在的生物标志物.

3.1 探究肺癌的发生与发展机制

早期肺癌的研究尤其是高危肺结节对揭示肺癌的起因具有重要意义. 而目前动物模型造模方法困难、周期长等技术瓶颈已然成为现阶段掣肘肺结节/早期肺癌机制解码的关键因素^[61]. 已有充足证据表明, 肺泡2型细胞(AT2)是肺腺癌的起源细胞, AT2细胞经类器官培养联合基因编辑技术可快速地在基因组和表型水平

密切模仿肺腺癌的发生发展^[62,63]。但遗憾的是, AT2细胞的分离及类器官培养程序仍然是复杂耗时的, 尤其是利用人源性AT2细胞(iPSC或患者组织)时, 需要专门的设备和复杂的细胞培养基, 并且存在肺泡表型不成熟、间充质细胞污染的风险, 失败率高^[64-66]。而最近的研究表明, 在类器官芯片上培养的患者来源AT2细胞显示出较低的上皮间质转化相关波形蛋白表达水平^[67], 说明微流控技术成功建立了相对成熟的AT2细胞体外模型, 可用作肺部疾病建模, 例如SARS-CoV-2感染, 这为快速构建稳定、成熟的AT2细胞来源肺癌模型提供了新的切入点, 对实现早期肺癌人群的精准治疗具有重要意义。

3.2 寻找候选生物标志物

明确的生物标记物是肿瘤精准诊疗的重要组成部分。研究人员开发了配备生物传感器或生物成像的类器官芯片, 无须从灌注培养系统中移除细胞即可持续监测培养基中细胞代谢水平, 进而判断前列腺癌、肝癌、乳腺癌等不同肿瘤细胞对抗肿瘤药物的不同反应^[68-70], 以发现候选药敏生物标志物, 如通过前列腺癌类器官芯片的集成分析功能可以快速检测给药前后前列腺癌相关的表观遗传生物标志物(RASSF1、APC和RAR β 基因高甲基化)的波动变化^[68]。然而, 肺癌类器官芯片在这一方面的研究却鲜有报道。因此, 具有普适性的类器官芯片将为我们提供实时评价药效和检测指标的集成化平台, 以期快速、精准地发现潜在的生物标志物, 进一步展现肺癌类器官模型发现适应证人群生物标志物的应用价值, 促使肺癌精准治疗快速发展。

3.3 肺癌PDOs药物筛选的流程优化

肿瘤类器官的药物筛选流程主要包括类器官的构建与鉴定、药物递送、反应检测与结果判读^[71]。为了构建稳定成熟的肺癌PDOs药物筛选流程, 必须结合正在研发的新技术对此流程进行优化, 保证肿瘤细胞的活力, 从而提高药物筛选的准确性与成功率^[72]。我们基于肿瘤类器官药物敏感性检测的一般流程^[71], 结合类器官芯片技术对肺癌PDOs的药物筛选流程进行了如下优化。(1) 类器官的构建: 患者同意做肿瘤类器官药物敏感性检测并签署知情同意后, 采集具有良好肿瘤性质的组织或体液, 并对肿瘤样本进行多组学分析, 接种在与成纤维细胞和血管内皮细胞共培养的微流控芯片上进行培养;(2) 类器官的鉴定: 采用光学、代谢

传感器来评估类器官生长状态, 检测肺癌代谢水平, 例如脂质、乳酸含量等;(3) 药物递送: 通过微通道灵活选择不同的药物方案进行测试, 如探究不同剂量下单一或多种组合化疗药物对类器官的敏感性或毒性测试;(4) 药物反应检测: 基于集成传感器实现动态类器官成像、活力测定及代谢产物的检测评估, 进一步预测药敏响应的生物标志物(如检测给药前后基因甲基化水平变化);(5) 结果判读: 基于观察到的活力测定和专门为肺癌PDOs开发的伴随生物标志物, 建立药物-分子对接关系, 从而产生可靠的反应预测。将检测结果评价及临床用药比较, 为患者的治疗方案提供参考。

类器官芯片以工程化的手段创造出多种活体细胞、体内生长因子/信号梯度、生物力刺激等复杂微环境成分, 具有高通量、多种传感器实时监测等优势, 为未来肺癌个性化药物筛选提供了新思路。

4 结论

美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)在2021年初发布了一份白皮书, 表明了其对类器官芯片在新药研发的积极态度, 希望通过建立标准化的模型平台, 逐步减少或替代动物模型, 并利用类器官芯片来填补各种疾病/生理模型的空白。特别是微流控技术使类器官在结构和功能上与患者体内更为贴近, 不仅为研究疾病表现的个体差异提供了可能, 高通量筛药和动态检测方法也为疾病机制研究和药物评价等应用领域提供了更加可靠的体外模型。不过, 它仍处于发展阶段, 在广泛应用之前还有许多挑战需要克服:(1) 尽管突破了类器官难以实现共培养或血管化的局限性, 但是目前的芯片仍然过于简单, 可能无法再现体内肺癌复杂的肿瘤微环境所导致的一系列功能变化, 对于医学研究, 还有很长的路要走;(2) 微流控芯片的原型制作材料是否导致有效药物浓度和药理活性降低, 还需要进一步验证;(3) 与其他微加工技术、生物传感技术等集成化形成自动化工作站, 提高了类器官技术开展相关应用和研究的成本, 且对专业技术人员的要求较高;(4) 各实验室对类器官芯片的设计、制作和类器官培养条件、检测指标都不尽相同, 缺乏标准化流程导致难以对各实验室的生化数据和实验结果进行横向比较。相信, 随着材料科学和制造技术的发展, 这些问题能够通过合理的结构设计和先进的加工方法得以解决, 在不久的将来, 类器官芯片最终将为肺癌类器官在个性化和精准医疗新时代的广泛应用奠定基础。

参考文献

- 1 Kolesar J, Peh S, Thomas L, et al. Integration of liquid biopsy and pharmacogenomics for precision therapy of EGFR mutant and resistant lung cancers. *Mol Cancer*, 2022, 21: 61
- 2 Chen F, Liu J, Flight R M, et al. Cellular origins of EGFR-driven lung cancer cells determine sensitivity to therapy. *Adv Sci*, 2021, 8: e2101999
- 3 Liang R, Li X, Li W, et al. DNA methylation in lung cancer patients: Opening a “window of life” under precision medicine. *Biomed Pharmacother*, 2021, 144: 112202
- 4 Cao M, Li H, Sun D, et al. Cancer burden of major cancers in China: A need for sustainable actions. *Cancer Commun*, 2020, 40: 205–210
- 5 Boumahdi S, de Sauvage F J. The great escape: Tumour cell plasticity in resistance to targeted therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19: 39–56
- 6 Hu Y, Sui X, Song F, et al. Lung cancer organoids analyzed on microwell arrays predict drug responses of patients within a week. *Nat Commun*, 2021, 12: 2581
- 7 Hofer M, Lutolf M P. Engineering organoids. *Nat Rev Mater*, 2021, 6: 402–420
- 8 Picollet-D’ahan N, Dolega M E, Freida D, et al. Deciphering cell intrinsic properties: A key issue for robust organoid production. *Trends Biotechnol*, 2017, 35: 1035–1048
- 9 Zhou Z Z, Pang Y, Sun W. Improving organoid construction quality: Bioprinting or manual operation (in Chinese)? *Chin Sci Bull*, 2022, 67: 2568–2569 [周珍珍, 庞媛, 孙伟. 提升类器官构建质量: 生物打印还是手动操作? 科学通报, 2022, 67: 2568–2569]
- 10 Zhuang L J, Liu M X, Jiang N, et al. Advances in the bioinspired olfactory sensing technology for screening of olfactory dysfunction (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2021, 66: 1886–1899 [庄柳静, 刘梦雪, 姜楠, 等. 仿生嗅觉感知技术及其在嗅觉障碍疾病筛查中的研究进展. 科学通报, 2021, 66: 1886–1899]
- 11 Yin J, Meng H, Lin J, et al. Pancreatic islet organoids-on-a-chip: How far have we gone? *J Nanobiotechnol*, 2022, 20: 308
- 12 Park S E, Georgescu A, Huh D. Organoids-on-a-chip. *Science*, 2019, 364: 960–965
- 13 Duzagac F, Saorin G, Memeo L, et al. Microfluidic organoids-on-a-chip: Quantum leap in cancer research. *Cancers*, 2021, 13: 737
- 14 Nashimoto Y, Okada R, Hanada S, et al. Vascularized cancer on a chip: The effect of perfusion on growth and drug delivery of tumor spheroid. *Biomaterials*, 2020, 229: 119547
- 15 Ozkan A, Ghousifam N, Hoopes P J, et al. *In vitro* vascularized liver and tumor tissue microenvironments on a chip for dynamic determination of nanoparticle transport and toxicity. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116: 1201–1219
- 16 Qu J, Kalyani F S, Liu L, et al. Tumor organoids: Synergistic applications, current challenges, and future prospects in cancer therapy. *Cancer Commun*, 2021, 41: 1331–1353
- 17 Kretschmar K. Cancer research using organoid technology. *J Mol Med*, 2021, 99: 501–515
- 18 Yu F, Hunziker W, Choudhury D. Engineering microfluidic organoid-on-a-chip platforms. *Micromachines*, 2019, 10: 165
- 19 Kim M, Mun H, Sung C O, et al. Patient-derived lung cancer organoids as *in vitro* cancer models for therapeutic screening. *Nat Commun*, 2019, 10: 3991
- 20 Li X, Larsson P, Ljuslinder I, et al. *Ex vivo* organoid cultures reveal the importance of the tumor microenvironment for maintenance of colorectal cancer stem cells. *Cancers*, 2020, 12: 923
- 21 Tao T, Wang Y, Chen W, et al. Engineering human islet organoids from iPSCs using an organ-on-chip platform. *Lab Chip*, 2019, 19: 948–958
- 22 Pinho D, Santos D, Vila A, et al. Establishment of colorectal cancer organoids in microfluidic-based system. *Micromachines*, 2021, 12: 479
- 23 Liu Q, Zhao T, Wang X, et al. *In situ* vitrification of lung cancer organoids on a microwell array. *Micromachines*, 2021, 12: 624
- 24 Suresh R, Ali S, Ahmad A, et al. The role of cancer stem cells in recurrent and drug-resistant lung cancer. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 890: 57–74
- 25 Mittal V, El Rayes T, Narula N, et al. The microenvironment of lung cancer and therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 890: 75–110
- 26 Fiorini E, Veghini L, Corbo V. Modeling cell communication in cancer with organoids: Making the complex simple. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 166
- 27 Neal J T, Li X, Zhu J, et al. Organoid modeling of the tumor immune microenvironment. *Cell*, 2018, 175: 1972–1988.e16
- 28 Grönholm M, Feodoroff M, Antignani G, et al. Patient-derived organoids for precision cancer immunotherapy. *Cancer Res*, 2021, 81: 3149–3155
- 29 Kitajima S, Ivanova E, Guo S, et al. Suppression of STING associated with LKB1 loss in KRAS-driven lung cancer. *Cancer Discov*, 2019, 9: 34–45
- 30 Poletti M, Arnauts K, Ferrante M, et al. Organoid-based models to study the role of host-microbiota interactions in IBD. *J Crohns Colitis*, 2021, 15: 1222–1235
- 31 Kim H, Sa J K, Kim J, et al. Recapitulated crosstalk between cerebral metastatic lung cancer cells and brain perivascular tumor microenvironment in a microfluidic co-culture chip. *Adv Sci*, 2022, 9: e2201785
- 32 Homan K A, Gupta N, Kroll K T, et al. Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids *in vitro*. *Nat Methods*, 2019, 16: 255–262

- 33 Nashimoto Y, Hayashi T, Kunita I, et al. Integrating perfusable vascular networks with a three-dimensional tissue in a microfluidic device. *Integr Biol*, 2017, 9: 506–518
- 34 Wu Q, Wei X, Pan Y, et al. Bionic 3D spheroids biosensor chips for high-throughput and dynamic drug screening. *Biomed Microdevices*, 2018, 20: 82
- 35 Sontheimer-Phelps A, Hassell B A, Ingber D E. Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19: 65–81
- 36 Schuster B, Junkin M, Kashaf S S, et al. Automated microfluidic platform for dynamic and combinatorial drug screening of tumor organoids. *Nat Commun*, 2020, 11: 5271
- 37 Wu Q. The study on lung cancer exhale diagnostic model optimizing and drug screening based on 3D organ-on-chip (in Chinese). Doctor Dissertation. Hangzhou: Zhejiang University, 2019 [吴谦. 肺癌呼气诊断模型优化及其药物筛选的3D细胞与类器官芯片研究. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学, 2019]
- 38 Shi Y F, Chen E G, Wu X H, et al. Development of multi-parameter lung cancer anticancer drug detection platform based on 3D cell and organoid-on-chips (in Chinese). In: Article Collection of the 42nd Academic Congress of Respiratory Diseases of Zhejiang Medical Association in 2020, 2020. 10–11 [施洋峰, 陈恩国, 吴晓虹, 等. 基于3D细胞及类器官芯片的多参数肺癌抗癌药物检测平台的开发. 见: 2020年(第四十二届)浙江省医学会呼吸病学学术大会论文集, 2020. 10–11]
- 39 Mencattini A, Di Giuseppe D, Comes M C, et al. Discovering the hidden messages within cell trajectories using a deep learning approach for *in vitro* evaluation of cancer drug treatments. *Sci Rep*, 2020, 10: 7653
- 40 Wu Q, Pan Y X, Wan H, et al. Research progress of organoids-on-chips in biomedical application (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2019, 64: 901–909 [吴谦, 潘宇祥, 万浩, 等. 类器官芯片在生物医学中的研究进展. 科学通报, 2019, 64: 901–909]
- 41 Zhang L, Zhao J, Liang C, et al. A novel biosensor based on intestinal 3D organoids for detecting the function of BCRP. *Drug Deliver*, 2017, 24: 1453–1459
- 42 Au S H, Chamberlain M D, Mahesh S, et al. Hepatic organoids for microfluidic drug screening. *Lab Chip*, 2014, 14: 3290–3299
- 43 Zhai J, Li C, Li H, et al. Cancer drug screening with an on-chip multi-drug dispenser in digital microfluidics. *Lab Chip*, 2021, 21: 4749–4759
- 44 Tan J, Sun X, Zhang J, et al. Exploratory evaluation of EGFR-targeted anti-tumor drugs for lung cancer based on lung-on-a-chip. *Biosensors*, 2022, 12: 618
- 45 Kim S K, Kim Y H, Park S, et al. Organoid engineering with microfluidics and biomaterials for liver, lung disease, and cancer modeling. *Acta Biomater*, 2021, 132: 37–51
- 46 Zhang Z, Shiratsuchi H, Lin J, et al. Expansion of CTCs from early stage lung cancer patients using a microfluidic co-culture model. *Oncotarget*, 2014, 5: 12383–12397
- 47 Hassell B A, Goyal G, Lee E, et al. Human organ chip models recapitulate orthotopic lung cancer growth, therapeutic responses, and tumor dormancy *in vitro*. *Cell Rep*, 2017, 21: 508–516
- 48 Paek J, Park S E, Lu Q, et al. Microphysiological engineering of self-assembled and perfusable microvascular beds for the production of vascularized three-dimensional human microtissues. *ACS Nano*, 2019, 13: 7627–7643
- 49 Jung D J, Shin T H, Kim M, et al. A one-stop microfluidic-based lung cancer organoid culture platform for testing drug sensitivity. *Lab Chip*, 2019, 19: 2854–2865
- 50 Xu Z, Li E, Guo Z, et al. Design and construction of a multi-organ microfluidic chip mimicking the *in vivo* microenvironment of lung cancer metastasis. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 25840–25847
- 51 Wiedenmann S, Breunig M, Merkle J, et al. Single-cell-resolved differentiation of human induced pluripotent stem cells into pancreatic duct-like organoids on a microwell chip. *Nat Biomed Eng*, 2021, 5: 897–913
- 52 Xu Z, Gao Y, Hao Y, et al. Application of a microfluidic chip-based 3D co-culture to test drug sensitivity for individualized treatment of lung cancer. *Biomaterials*, 2013, 34: 4109–4117
- 53 Ruzycka M, Cimpan M R, Rios-Mondragon I, et al. Microfluidics for studying metastatic patterns of lung cancer. *J Nanobiotechnol*, 2019, 17: 71
- 54 Li W, Liu J B, Hou L K, et al. Liquid biopsy in lung cancer: Significance in diagnostics, prediction, and treatment monitoring. *Mol Cancer*, 2022, 21: 25
- 55 Jansson S, Bendahl P O, Larsson A M, et al. Prognostic impact of circulating tumor cell apoptosis and clusters in serial blood samples from patients with metastatic breast cancer in a prospective observational cohort. *BMC Cancer*, 2016, 16: 433
- 56 Cho H, Kim J, Song H, et al. Microfluidic technologies for circulating tumor cell isolation. *Analyst*, 2018, 143: 2936–2970
- 57 Farshchi F, Hasanzadeh M. Microfluidic biosensing of circulating tumor cells (CTCs): Recent progress and challenges in efficient diagnosis of cancer. *Biomed Pharmacother*, 2021, 134: 111153
- 58 Praharaj P P, Bhutia S K, Nagrath S, et al. Circulating tumor cell-derived organoids: Current challenges and promises in medical research and precision medicine. *Biochim Biophys Acta-Rev Cancer*, 2018, 1869: 117–127
- 59 Gao D, Vela I, Sboner A, et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell*, 2014, 159: 176–187

- 60 Drapkin B J, George J, Christensen C L, et al. Genomic and functional fidelity of small cell lung cancer patient-derived xenografts. *Cancer Discov*, 2018, 8: 600–615
- 61 Huo K G, D'Arcangelo E, Tsao M S. Patient-derived cell line, xenograft and organoid models in lung cancer therapy. *Transl Lung Cancer Res*, 2020, 9: 2214–2232
- 62 Naranjo S, Cabana C M, LaFave L M, et al. Modeling diverse genetic subtypes of lung adenocarcinoma with a next-generation alveolar type 2 organoid platform. *Genes Dev*, 2022, 36: 936–949
- 63 Miura A, Yamada D, Nakamura M, et al. Oncogenic potential of human pluripotent stem cell-derived lung organoids with HER2 overexpression. *Int J Cancer*, 2021, 149: 1593–1604
- 64 Jacob A, Morley M, Hawkins F, et al. Differentiation of human pluripotent stem cells into functional lung alveolar epithelial cells. *Cell Stem Cell*, 2017, 21: 472–488.e10
- 65 Hiemstra P S, Tetley T D, Janes S M. Airway and alveolar epithelial cells in culture. *Eur Respir J*, 2019, 54: 1900742
- 66 Witherden I R, Tetley T D. Isolation and culture of human alveolar type II pneumocytes. *Methods Mol Med*, 2001, 56: 137–146
- 67 van Riet S, van Schadewijk A, Khedoe P P S J, et al. Organoid-based expansion of patient-derived primary alveolar type 2 cells for establishment of alveolus epithelial lung-chip cultures. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*, 2022, 322: L526–L538
- 68 Heninger E, Kosoff D, Rodems T S, et al. Live cell molecular analysis of primary prostate cancer organoids identifies persistent androgen receptor signaling. *Med Oncol*, 2021, 38: 135
- 69 Riahi R, Shaegh S A M, Ghaderi M, et al. Automated microfluidic platform of bead-based electrochemical immunosensor integrated with bioreactor for continual monitoring of cell secreted biomarkers. *Sci Rep*, 2016, 6: 24598
- 70 Choi Y, Hyun E, Seo J, et al. A microengineered pathophysiological model of early-stage breast cancer. *Lab Chip*, 2015, 15: 3350–3357
- 71 Zhao B, Song W, Wang H X. Chinese experts consensus on quality control standards for tumor organoids diagnosis and treatment platform (2022 version) (in Chinese). *China Oncol*, 2022, 32: 657–668 [赵冰, 宋伟, 王海霞. 肿瘤类器官诊治平台的质量控制标准中国专家共识(2022年版). *中国癌症杂志*, 2022, 32: 657–668]
- 72 Bengtsson A, Andersson R, Rahm J, et al. Organoid technology for personalized pancreatic cancer therapy. *Cell Oncol*, 2021, 44: 251–260

Summary for “基于微流控技术的类器官芯片在肺癌精准治疗中的应用”

Application of organoids-on-a-chip based on microfluidic technology in precision medicine of lung cancer

Xiao Zeng¹, Qiong Ma¹, Xueke Li¹, Liting You², Jia Li¹, Xi Fu¹, Yifeng Ren¹ & Fengming You^{1,3*}

¹ Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China;

² Department of Laboratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

³ Cancer Institute, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China

* Corresponding author, E-mail: yfmdoc@163.com

Lung cancer is the most common malignant tumor in the world in terms of morbidity and mortality. There is a pressing need to improve the overall survival rate through personalized treatment. Specifically, customized drug screening and the research and development of a new drug are crucial. With the development of *in vitro* three-dimensional culture technology, patients-derived organoids (PDOs) can preserve the true genetic heterogeneity of original tumors, which has been investigated in many fields, such as disease modeling and drug discovery. However, limitations are hindering further clinical translation and application. Therefore, an active effort has been made to optimize organoid culture technology to enhance its usability.

Organoids-on-a-chip is an extension of organoids in biotechnology, which can effectively compensate for the shortcomings of traditional organoid culture technology. Taking microfluidic chip technology as the core, the organoids-on-a-chip can automatically and accurately mimic the micro-environment that organoid culture needs, such as biochemical factors, oxygen and shear force through microchannel processing or manipulating small fluid at the microenvironment level. Furthermore, it simulates the cell-cell and cell-extracellular matrix interactions and reshapes the biochemical and biomechanical characteristics of the tumor microenvironment, which is expected to better translate the results from basic cancer research to precision medicine. In this review, we first summarize the advantages of organoids-on-a-chip based on microfluidics as a personalized drug screening model, including precise control of the physical and chemical environmental factors, simulating the tumor microenvironment and significantly improving throughput and dynamic and continuous monitoring of organoids. Then, the latest progress of organoids-on-a-chip based on microfluidic technology in lung cancer research is summarized. These devices help researchers explore the complex tumor-stromal cell interactions of angiogenesis and tumor metastasis in TME of lung cancer, which can accelerate the research of related molecular mechanisms and drug analysis. This can also significantly reduce the quantity requirement of PDOs culture. PDOs can react quickly in a microfluidic chip, with less reagent consumption and simple manual operation, which significantly simplifies the complicated drug screening process at an early stage. Additionally, we discuss the application prospects and development directions of organoids-on-a-chip for lung cancer; it is proposed that the integrated platform based on microfluidics and sensors can explore the tumorigenesis of lung cancer and discover potential biomarkers, which will create new opportunities for personalized diagnosis and treatment. Finally, we study the drug screening process of PDOs, aiming to promote precision medicine by optimizing and improving the drug screening process.

In conclusion, organoids-on-a-chip have the advantage of being controllable, high-throughput and dynamic and can be continuously monitored, which provides the possibilities of large-scale and automatic standardization of PDOs culture. It is of great significance to improve the success rate of organoid model construction and the accuracy of drug screening and expand the application scope of organoids. Although still in the development stage, and there are many challenges to be overcome, we believe that soon, organoids-on-a-chip will lay the foundation for the widespread application of lung cancer organoids in the new era of personalized and precision medicine.

lung cancer, patients-derived organoids, drug screening, microfluidic chip, organoids-on-a-chip

doi: [10.1360/TB-2022-1027](https://doi.org/10.1360/TB-2022-1027)