

专家共识

用于药物性肝损伤评价的人肝器官芯片技术规范专家共识

用于药物性肝损伤评价的人肝器官芯片技术规范专家共识编写专家组

摘要: 药物性肝损伤 (DILI) 是药物安全性评价的重要内容, 当前的评价手段主要局限于体外二维细胞培养模型及动物模型, 无法真实模拟人体复杂的生理环境, 对药物代谢及毒性的预测也能力有限。因此, 需要发展能够准确再现人体正常肝组织功能及其对药物毒性反应的体外肝脏替代模型。人肝器官芯片技术应运而生, 不仅具有比二维细胞模型更完善的生理微结构和功能, 还能消除动物与人的种属差异, 成为有效模拟人体肝脏生理或病理状态的平台。目前, 人肝器官芯片作为一种新型的体外拟人化模型, 在 DILI 检测领域尚处于初期发展阶段, 尚未形成标准操作流程或指南体系, 然而, 其展现的巨大开发潜力和应用前景引起了广泛关注。本共识聚焦于 DILI 的评价, 依托人肝器官芯片平台, 综合国内外相关模型构建方案、毒性检测指标和药物清单, 以及实际研究报道和数据, 形成这一专家共识, 给出相关建议, 旨在促进人肝器官芯片技术的持续优化与创新, 加速其在 DILI 检测中的应用, 为药物研发与安全评估提供更为可靠且高效的体外实验工具。

关键词: 人肝器官芯片; 药物性肝损伤; 技术规范; 专家共识

中图分类号: R318 文献标志码: A 文章编号: 0258-8021(2024)05-0513-12

Expert Consensus on Technical Specification of Human Liver-on-Chip for Evaluating Drug-Induced Liver Injury

Compiling Expert Group for Expert Consensus on Technical Specification of Human
Liver-on-Chip for Evaluating Drug-Induced Liver Injury

Abstract: Drug-induced liver injury (DILI) is an important part of drug safety evaluation. Existing evaluation methods mainly rely on *in vitro* two-dimensional cell culture models and animal models, which cannot simulate the human complex physiological environment and have limited predictive ability for drug metabolism and toxicity. Therefore, it is necessary to develop *in vitro* liver replacement models that can accurately reproduce normal functions of human liver and its responses to drug toxicity. Human liver-on-chips not only have more comprehensive physiological microstructures and functions than two-dimensional cell models, but also eliminate species differences between animals and humans, and more effectively simulate the physiological or pathological state of human liver. At present, the human liver-on-chip, as a novel *in vitro* anthropomorphic model for DILI detection, is still in the initial development stage and has not yet formed a unified standard or guideline. However, its enormous potential and application prospects have attracted widespread attention. This consensus is oriented to the evaluation of DILI, relying on the human liver-on-chip platform, combined with relevant domestic and foreign model construction schemes, toxicity detection indicators and drug lists, as well as research literatures and data, to form this expert consensus and provide relevant suggestions. The consensus is aiming to promote the development of human liver-on-chip technology and its application in the detection of DILI.

Key words: human liver-on-chip; drug-induced liver injury; technical specification; expert consensus

doi: 10.3969/j.issn.0258-8021.2024.05.001

收稿日期: 2023-12-20, 录用日期: 2024-05-19

* 通信作者 (Corresponding author) E-mail: gu@seu.edu.cn; zhangjuan@seu.edu.cn

引言

肝脏作为人体内至关重要的器官,承载着解毒、代谢、合成糖原和白蛋白以及分泌胆汁等多重功能,对维持生理稳态具有不可或缺的重要作用^[1]。肝脏组织由实质细胞(parenchymal cells, PCs)和非实质细胞(non-parenchymal cells, NPCs)或间质细胞等不同细胞类型构成,实质细胞和非实质细胞比例大约为1:1。肝实质细胞是具有肝功能的细胞,而肝非实质细胞是不具有肝功能的细胞,主要发挥连接或支撑肝实质细胞的作用,其中包括占比高达44%的肝窦状内皮细胞。肝内的巨噬细胞[如库普弗细胞(Kupffer cell)、自然杀伤细胞[如陷窝细胞(pit cell)、单核细胞、肝星状细胞和肝树突状细胞等,以及间质细胞[如贮脂细胞(fat-storing cells, FSC)]^[1]。目前,药物的有效性和安全性的评估主要依赖细胞培养和动物模型两种实验方案。研究药物对肝脏的影响,动物模型或体外二维(2 dimensions 2D)细胞培养模型是最为常见的选择,但均存在不容忽视的局限性^[2]。由于动物模型所固有的种属差异,其产出的数据与人类代谢情况的结果相关性常显不足,且常伴随伦理争议;另外2D静态培养模型尽管操作简便,但因缺乏在体的复杂生理微环境,对药物在人体内的代谢过程和毒性效应的预测能力较差。因此,发展能够准确再现人体正常肝组织功能及其对药物毒性反应的体外肝脏替代模型,已成为亟待解决的科学问题^[3]。

肝器官芯片是一种利用微流控技术构建的仿真人体肝脏组织或功能单元的仿生器官芯片,可模拟肝脏的微结构、微环境和代谢活动等功能,并显著超越了传统的2D细胞模型,在生理微结构和功能完整性方面实现了质的飞跃,更重要的是能消除动物与人类之间的种属差异,为精准有效地模拟人体器官的生理或病理状态提供了可能^[2],为肝脏疾病研究以及肝毒性药物筛选等开辟了新路径,提供了高效可靠的动物替代实验平台^[3]。美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)已开始探索利用肝器官芯片平台进行药物毒性测试,旨在逐步减少或替代传统动物毒理学实验,推动药物研发及毒理学实验向更加高效的方向发展^[4]。鉴于人肝器官芯片技术在药物性肝损伤(drug-induced liver injury, DILI)检测领域展现出的巨大潜力与应用前景,汇聚国内外最新研究成果与数据,制定本专家共识。旨在为我国人肝器官芯片

技术的快速发展提供科学指导,推动其在药物安全评估中的广泛应用。

1 药物性肝损伤概述

全球范围内,对DILI的关注日益增加。引发肝脏损伤的药物类型多种多样,绝大多数药物是脂溶性的,在肝脏中代谢再通过胆汁或尿液排出。据统计,全球范围内已有1 100多种上市药物具有潜在肝毒性,常见的包括麻醉剂、抗癌药、抗生素、抗逆转录病毒药物、抗结核药物、心脏相关治疗药物、代谢性疾病用药、某些生物制剂以及传统中药和草药等^[4-5]。在我国,普通人群中DILI年发生率至少为23.80/10万,凸显了这一问题的严峻性。除传统中药/草药和膳食补充剂外,抗结核药、抗肿瘤药、免疫调节剂和抗生素等是我国引起肝损伤更常见的药物^[6]。

1.1 药物性肝损伤的机制

DILI的机制主要有两种:1)药物及其代谢物直接毒性的结果;2)免疫介导机制引发的炎症反应。不同机制间可能存在相互关联,例如,由于直接药物毒性引起的初始肝细胞破坏可能会因随后的炎症反应而进一步增强。具有显著肝脏代谢效能的口服药物更有可能导致DILI^[7]。基于上述情况,可将DILI分为固有型(直接损伤型)和特异质型,具体定义见中华医学会药物性肝病组制定的《药物性肝损伤诊治指南》^[8]。固有型DILI具有剂量依赖性、可预见性和潜伏期较短(数小时到数日)的典型特征。特异质型DILI通常不具有剂量依赖性(但阈值剂量通常达50~100 mg/d)、难以预见和潜伏期差异大(数日至数周)等特点。然而,固有型DILI和特异质型DILI的发病机制既存在共性,也展现出诸多显著的差异性。共性在于,两者的发病均与药物的化学性质(特别是亲脂性和生物转化)有关,活性代谢产物与宿主蛋白共价结合并引起氧化应激,激活多种炎症信号通路,诱发线粒体和内质网等细胞器应激,干扰胆汁酸转运。差异性则主要表现在,对少部分具有特定人类白细胞抗原(human leukocyte antigens, HLA)遗传背景的患者,固有免疫的激活提供了共刺激信号和药物半抗原与宿主蛋白形成的加合物,可激活HLA限制性适应性免疫应答,从而引发特异质型DILI的发生^[5-9]。

1.2 临床分型及诊断

1.2.1 基于病程的分型

基于病程(损伤持续时间),DILI可分为急性和

慢性。目前国际上对于界定慢性 DILI 的具体病程时长尚无统一标准。美国和中国的相关指南认为,急性肝损伤发生 6 个月后,血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)及总胆红素(total bilirubin, TBIL)仍持续异常,或存在门静脉高压或慢性肝损伤的影像学和组织学证据时,可界定为慢性 DILI^[10-11]。而欧洲指南和 2019 年发布的国际医学组织理事会(Council for International Organizations of Medical Sciences, CIOMS) DILI 国际共识则认为急性肝损伤发生后的 1 年才是界定慢性 DILI 的最佳时间节点^[12]。

1.2.2 基于损伤的分型

基于损伤的临床病理学特征,DILI 可分为肝细胞损伤型、胆汁淤积型和混合型^[4]。由国际医学组织理事会(The Council for International Organizations of Medical Sciences, CIOMS)初步建立并持续修订的判断依据如下^[4, 13-14]: 1) 肝细胞损伤型:肝细胞损伤或坏死,生化指标表现为 $ALT \geq 3 \times$ 正常值上限(upper limit of normal, ULN)且 $R \geq 5$; 2) 胆汁淤积型:胆汁分泌异常导致的轻度胆汁淤积,肝实质无变化,生化指标表现为 $ALP \geq 2 \times$ ULN 且 $R \leq 2$; 3) 混合型:胆汁淤积伴有肝实质损伤,生化指标表现为 $ALT \geq 3 \times$ ULN、 $ALP \geq 2 \times$ ULN 且 $2 < R < 5$ [$R = (ALT \text{ 实测值} / ALTULN) / (ALP \text{ 实测值} / ALPULN)$]。

通常 R 值计算是基于首次可获得的异常肝脏生化检查。ALT 缺失时,可用 AST 取代进行计算;但 ALP 缺失时, γ 谷氨酰转肽酶(γ glutamyl transpeptidase, GGT)无法很好替代^[12]。

共识 1: DILI 是指在药物使用过程中,因药物固有毒性引起的肝损害,或因患者的特异体质导致的肝损害。DILI 临床分型主要基于病程以及基于损伤这两个方面进行划分。对于基于损伤的临床病理分型,CIOMS 已建立并持续优化了各分型所对应的生化指标判断标准。用于药物肝损伤预测的肝器官芯片的构建和预测性能,需充分考虑临床的肝损伤的机制和判断依据。

2 人肝器官芯片构建

器官芯片(organ-on-a-chip)依托于精密的微加工技术,是一种微流控芯片仿生系统,可以模拟人体特定器官的复杂微结构、微环境和生理功能,亦称为微生理系统(microphysiological system)。肝器官芯片作为该领域重要分支,融合了微流控、干细胞

培养和生物材料等交叉学科,为药物评估和疾病模型构建提供了强有力的工具。其内含模拟人体肝脏功能的关键单元(如肝小叶)、肝脏组织的微结构(如肝血窦)以及模拟肝脏的生理或病理微环境,支持肝脏的基础代谢活动,如白蛋白分泌和尿素合成等。其基本原理在于将肝脏细胞(包括实质细胞和其他非实质以及支持细胞)、培养液以及生物材料相结合,共同构建成一个微流体芯片装置,能够部分模拟肝脏功能或最小功能单元^[15]。

人肝器官芯片通过精准复制肝脏的微结构、维持细胞的高活力和表型稳定,并模拟人肝脏的生理或病理特征,实现对人体肝脏生理或病理状态的高效仿真^[16]。在药物研发领域,对于可进行药物肝损伤预测的肝器官芯片,必须具备肝脏正常的代谢及解毒功能,以确保预测评估的准确性和可靠性^[17-18]。因此,在人肝器官芯片构建过程中,需对肝细胞来源需严格筛选和质控,对芯片设计需构建标准化规范,这些质控的关键环节,需不断优化和完善。

2.1 肝器官芯片模型

2.1.1 肝细胞来源选择

用于构建人肝器官芯片的潜在肝细胞来源可分为 3 个大类:原代细胞、永生化细胞系和干细胞(包括诱导多能干细胞、胚胎干细胞或成体干细胞)^[19-20]。为了构建能充分反映肝脏复杂结构和功能的肝器官芯片模型,可以将肝细胞与非实质细胞进行共培养。这几类细胞的特征如下:

原代肝细胞:从肝脏活检或非移植肝脏中获得的人原代肝细胞(primary human hepatocyte, PHH),目前被认为是开发与人相关的体外肝脏模型的金标准,具有较好的细胞结构和功能表型特征^[21-23]。

肝细胞系:PHH 的替代选择是永生化肝细胞系,如 HepaRG、Fa2N-4、HepG2/C3A、Hep3B、Huh7。肝细胞系无论来源于肿瘤组织(肝细胞性肝癌)还是由原代肝细胞的永生化获得。均因其诸多独特优势而在药物代谢和毒理学研究中得到广泛应用。这些优势特点包括无限的增殖潜力、良好的可操作性、广泛的可用性、表型的稳定性、降低的供体间变异性以及设计和制作的相对低成本。然而,尽管有上述出色表现,在模拟真实肝脏的代谢活性和对肝毒素敏感性方面仍存在性能局限和功能不足,因此,这类芯片更适用于药物评价的初步阶段,作为筛选和初步评估的工具^[21, 24-25]。

干细胞:目前,胚胎干细胞和成体干细胞的使

用相对较少,而人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)可通过多种方案进行分化,并产生可重现许多肝脏特征的肝类器官,包括形态学、白蛋白合成和尿素分泌、糖原储存和药物代谢等^[21-22, 26-27]。此外,hiPSCs的优点还包括较小的批次变异性和良好的敏感性(与PHH相当),可用于检测化合物或药物引起的肝毒性评估^[28-29]。然而,hiPSCs的广泛应用仍存在一些局限性:肝细胞未完全成熟、表观遗传记忆以及较高的成本和较长的实验时间。

非实质性细胞(non-parenchymal cells, NPCs):对PHH而言,肝器官芯片中发育的NPC主要有3个来源:原代细胞、肝细胞系和hiPSCs^[21, 30]。尽管原代NPC被认为是复制体内微环境的理想选择,但由于其分离过程繁琐复杂、可用性差、产量低,且伴有杂质或污染风险,加之高昂的成本和在体外培养中功能可能快速衰退等问题,使得其在实际应用中受到限制^[21, 31-32],作为原代NPC的替代,目前多采用几种永生化细胞系用于与肝细胞共培养。

共识2:建议根据人体肝脏实质细胞和非实质细胞类型和比例,将肝细胞和非实质性细胞在器官芯片中进行共培养,构建肝器官芯片模型,或者利用干细胞自组装分化构建肝类器官芯片模型。模型能够充分反映肝脏复杂结构和功能,为进一步的DILI体外实验提供基础。

2.1.2 肝器官芯片模型构建

针对用于DILI检测的肝器官芯片模型,为了提高对人肝毒性的预测,需重点考虑的是肝器官芯片中细胞与细胞基质的相互作用。基于现有文献和报道,肝器官芯片模型构建从种类上可分为如下几类:

肝器官芯片2D单层培养:在开发细胞单层培养微流体芯片系统时,最常见的方法是基于软光刻技术制备图案衬底。已经证明,在这些基质上培养肝细胞,通过精确和可重复地控制不同细胞类型的空间分布,并结合细胞外基质递送生物化学信号,可促进肝细胞功能的形成和维持,提高了细胞培养的效率和一致性^[33]。

肝器官芯片上无基质肝球体/类器官:先前描述的2D单层培养方法,虽然能一定程度的模拟细胞行为,但不能反映体内细胞所处的复杂立体结构和生理微环境。为此,已有研究探索在体外构建三维(3 dimensions, 3D)生理环境,形成仿生肝小叶样微生理结构^[34]。已有多种设计采用不同方法用于构建3D细胞通信网络,如悬挂液滴和旋转烧瓶,以

及在非粘附表面上培养细胞和微结构等^[35]。这些方法的原理是通过施加外力或通过调节细胞自组装来重新组装细胞。悬浮中重新生成的细胞经过自组装或细胞聚集体的形成步骤,将出现压实现象,形成紧凑的3D微结构(球体或类器官)。

支架/水凝胶3D肝类器官芯片:肝脏研究和开发的主要焦点之一是获得细胞3D组织的相关肝脏结构和功能。除了已提及的细胞自组装方法外,可以使用集成在微流体芯片内的水凝胶/支架基质(海藻酸盐、透明质酸等)获得细胞的3D组织。使用水凝胶和支架可以模拟细胞外基质(extracellular matrix, ECM)自然环境,并提供通过改变基质组成和/或机械性能来调节细胞微环境的可能性^[36-37]。

生物打印3D肝类器官芯片:目前3D生物打印技术已用于制造芯片上的器官模型。生物打印和器官芯片的结合可以在体外创建复杂的仿生模型,用于药物功能调控和机制探索等^[38]。

目前,肝类器官可能作为后期芯片应用发展的标准体系,其直径约100~300 μm时,相关功能性指标如白蛋白、尿素和胆汁酸等的产生能力较为稳定。

典型的肝脏芯片构建流程包括:

1) 使用具有良好生物相容性的材料构建多腔室结构或肝脏仿真结构芯片。

2) 在芯片内接种肝原代细胞、肝类器官、肝细胞系或干细胞分化的肝实质细胞以及肝非实质细胞(如肝星状细胞、肝窦内皮细胞、肝库否细胞和胆管细胞)构成多细胞培养体系。

3) 控制微流体流速在0.1~5.0 dyne/cm²范围内,并根据人体正常肝脏和疾病肝脏结构调整芯片内多细胞比例及空间结构,使芯片具备稳定的细胞活力和肝脏功能,包括维持白蛋白、尿素等代谢产物的稳定分泌,以及确保代谢酶与转运体基因的mRNA或酶活性的稳定表达,从而模拟肝脏微环境。

共识3:肝器官芯片模型构建方式丰富多样,不同的构建方式有其独自优势和不足或局限,因此,需根据实验目的进行选择。各种类型肝器官芯片模型的构建过程遵循统一的原则和构建流程,当进行DILI评价时,推荐以此通用构建流程为基础,建立肝细胞与细胞基质相互作用较好的器官芯片模型,并维持其代谢功能。

2.2 肝器官芯片特性要求

2.2.1 遵循生物学规范

正常肝脏器官的主要指标包括白蛋白、尿素和细胞色素P450(cytochrome P450, CYP)酶等,作为

肝脏特异性生物标志物,反映肝脏代谢功能状态,可用于评估肝器官芯片模型与人体肝脏功能的相似度。其余如 ALT 和 AST 等亦是反映肝脏功能不可或缺的重要指标,当肝细胞受损时,上述酶类从胞内释出。白蛋白的产生过程复杂,始于肝细胞内转录前白蛋白原,经翻译和切割 N 末端肽以形成前白蛋白,随后从粗面内质网释放,并在高尔基体内切割成白蛋白,最后输出到血清^[39-40]。尿素的合成则依赖于有适当代谢活性的活性线粒体,其负责支持胞内氨的生化转化^[41]。这些生物标志物共同揭示了一系列肝细胞器功能,并提供了对肝细胞整体健康状况了解的观察视角。吸收、分布、代谢以及排泄 (absorption, distribution, metabolism and excretion, ADME) 相关基因的转录减少是与肝细胞代谢功能损伤有关的早期信号。因此,优化肝器官芯片的肝生理功能表达,以维持 ADME 基因至关重要^[42]。这不仅有助于确保在药物测试期间产生足够的代谢物,还能通过降低基线系统的变异性,增加

毒性测试终点的可靠性。因此,建议针对人肝器官芯片模型,在第一阶段(以 14 d 为一个周期计算),以白蛋白、尿素以及相关关键药物代谢 I/II 期酶与转运体的基因表达作为肝功能的表征指标(见表 1)^[43]。当达到第一阶段指标阈值后,可进入第二阶段,面向更多更深入的表征指标(见表 2),包括主要药物代谢酶和转运蛋白功能和形态学分析以及细胞因子稳定性(当有库否细胞或星状细胞时)和肝胆网络完整性的评估,基于上述评估结果,可考虑做出继续或终止测试的决定^[43]。

2.2.2 遵循工程学规范

工程学规范是构建肝器官芯片模型的关键,为了使肝器官芯片能够应用于医药研发,需要满足以下关键特征^[44-45]:

1) 具有结构和功能的稳健性、易用性和较高的通量水平,可以生成器官芯片验证所需的大量可靠生物数据,操作简便、能稳定一致、可长期跟踪且维护费用低。

表 1 肝器官芯片模型表征第一阶段指标细则

Tab.1 Detailed rules for phase 1 indicators of liver-on-chip model characterization

检测指标	功能评估	表征细则
白蛋白产生	肝脏内转录、翻译、加工以及输出功能	$\mu\text{g}/\text{d}/10\times 10^5$ 个肝细胞; (细胞计数仪) 日产量保持稳定的天数: 标注平均日产量 CV
尿素合成	线粒体与生化合成	$\mu\text{g}/\text{d}/10\times 10^5$ 个肝细胞; (细胞计数仪) 日产量保持稳定的天数: 标注平均日产量 CV
基线定量基因表达分析	代谢酶与转运体基因的 mRNA 或酶活性的表达	I 相代谢酶: CYP3A4, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2, CYP2D6, CYP2C8, CYP2E1 II 相代谢酶: UGT1A1, GSTA1 肝细胞摄取转运体: SLC01B1, SLC01B3, SLC22A1 肝细胞外流转运体: ABCG2, ABCG2, ABCB1, ABCB11

表 2 肝器官芯片模型表征第二阶段指标细则

Tab.2 Detailed rules for phase 2 indicators of liver-on-chip model characterization

检测指标	功能评估	细则
丙氨酸氨基转移酶(ALT)	随着时间变化,细胞损伤的迹象和微生理系统稳定性	14 d 内的每日平均基线释放水平 $\leq 30\%$ CV
使用一组标准探针底物检测基线和诱导的代谢酶的功能活性	衡量 CYP450 酶的能力和诱导能力	3A4(诱导剂: 利福平) 1A2(诱导剂: 奥美拉唑) 2B6(诱导剂: 苯巴比妥) 2C9(诱导剂: 双氯芬酸) 2D6(诱导剂: 右美沙芬)
转运功能和胆汁酸平衡: 摄取、代谢和输出	测量转运底物和胆汁酸在介质中摄取、代谢、共轭,以及输出的日速率	使用荧光探针底物评估转运体功能: OATP/MRP2/BSEP NTCP/BSEP/MRP2 使用稳定标签的生化试剂与质谱法评估胆汁酸的运输量
微生理系统组织学	允许与正常人体内的肝脏结构和细胞形态进行比较	-免疫组化: 肝细胞(HNF- α); 胆管(BSEP, MRP2); 枯否细胞(CD68); 星状细胞(desmin) -HE 染色显示存在多角形、非圆形、苏木精阳性、极化的肝细胞

2) 使用非特异性结合最小、对肝细胞功能影响最小且具有生物相容性的材料。在基于生理学的药代动力学建模中,非特异性吸收和药物清除会影响肝器官芯片的实用性,需要证明在细胞存在和不存在的情况下,在消除疏水性药物方面存在可测量的差异。

3) 芯片材质以硅、玻璃、金属材料和高分子聚合物等材料为基材,利用微纳加工和精密注塑等技术,加工制成生物芯片。多孔膜来源包括苯二甲酸乙二醇酯膜和聚二甲硅氧烷膜等。

4) 应明确微流控芯片上培养腔室数量和尺寸。一张芯片上可设置一个或多个重复培养单元,用来培养及检测一个或多个样本。还应明确微流控芯片上培养腔室的尺寸。尺寸应符合产品要求,可以有不同规格的尺寸。

5) 肝脏模块的功能取决于对其暴露于剪切力的程度以及足够氧气和营养的供给,生理参数设计时需考虑设置流速的上限和下限,适宜上限保护肝脏细胞免受物理损伤,下限设置需保证培养介质中的氧含量维持适宜。因此,核心原则是基于人体肝脏血液流速设计适配肝器官芯片的流速。

6) 应按照 GB/T 2410-2008 的规定进行透光率测定。微流控芯片培养腔室位置对可见光的光谱(390 ~ 780 nm)应有一定的透过性,可根据检测需求设定,应不小于芯片及其附属材料的最小透光率的80%。

7) 应按照 GB/T 2423.23-2013 第6章试验 Qd:容器的密封(漏液)性。对微流控芯片按照正常试验条件进行测定,测定后各芯片应确保密封性良好,做到各独立腔室试剂无相互串扰和无漏泄,芯片及附属部分试剂无漏泄。微流控芯片及其附属材料在使用工作温度 $\pm 20.0^{\circ}\text{C}$ 范围内,外观应无形变和无破损。

8) 应合理的考虑芯片的产量,以满足在同一实验中同步进行阳性和阴性对照以及满足进行适当数量的复制。还应考虑在工业规模上如何实现高质量高产量的可靠生产,如采用注塑成型等工艺,这些高效工艺方法成本低且一致性好,适用于高产量的器官芯片制造。此外,在大批量制造塑料芯片的过程中,还需要结合芯片对准、组装和键合等自动化技术,提高生产效率,减少人为误差。

9) 在构建芯片系统外设接口时,应考虑兼容已有的采样及分析单元,为此,系统应努力兼容现有的或特定的分析和成像仪器,以便能够测量更多的

分子和功能数据。同时,芯片系统应包含易于操作的采样接口,对基于流动系统的流出物以及细胞产出物质(如蛋白质和 mRNA 等)进行采样。

2.2.3 优化培养体系

为保证实验的可重复性和准确性,还需提供适宜的细胞培养方式方法。

1) 优选培养基与营养因子:选择与生理环境密切相关且兼容良好的培养基类型,适当调控营养物质浓度和基本生长因子配比,尽可能模拟或兼容在体细胞生长的自然环境。

2) 控制联合培养比例:在芯片系统中,需控制肝细胞、内皮细胞、库否细胞、星状细胞和胆汁上皮细胞的比例与人体肝脏上述细胞类型的比例相吻合。

3) 保证长期培养的稳定性:针对两周或更长时间的培养,需保障肝细胞表型和代谢功能维持稳定。

共识 4:构建肝器官芯片模型需遵循生物学规范和工程学规范,确保所构建的模型能够准确再现肝功能结构特征;模型构建过程中,需满足一系列关键指标的规范要求,包括白蛋白、尿素、相关关键药物代谢 I/II 期酶与转运体的基因表达、形态学、细胞因子稳定性和肝胆网络的完整性等;针对选材、用才以及实验操作,需按要求及规范进行,需严格遵守操作规程。为保证实验的可重复性和结果的准确性,还需优化细胞培养方案,提供合适的细胞培养方式方法,以此成功打造优质的人肝器官芯片模型,为后续的探索研究奠定坚实基础。

3 人肝器官芯片对 DILI 预测性能评价

3.1 适用范围

在药物研发领域,肝脏毒性是限制其进入临床和上市的主要瓶颈之一。当前许多研究热衷于构建一种创新的肝毒性评价体系,该体系应能保留体内肝脏细胞微环境的物质结构,能模拟体内肝脏组织的各项功能,支持长期重复给药,在进行药物安全性评价时,能实现高效、准确、直观且可控的肝毒评价,这已成为该领域的研究热点和努力方向^[46]。肝类器官的构建为实现肝脏毒性评价搭建了强有力的平台,其独特性在于具有人源性、遗传稳定性以及支持高通量筛选等优势。引入器官芯片技术,能将多种肝脏细胞进行协同培养,从而更精准地模拟人体内肝脏功能和微环境,为药物毒性测定开辟了更为精确的模式。目前,美国食品与药品监督管理局已经率先已探索利用肝类器官进行食品添加剂和营养补充剂的肝毒性测定^[47]。因此,人肝器

官芯片模型在 DILI 的预测评价领域展现出良好的应用前景,其适用范围包括但不限于以下几方面: 新药研发过程中的安全性评估以及食品添加剂和营养补充剂的肝毒性评估等。

3.2 药物肝脏毒性实验测试指标选择

反映肝细胞功能的人类肝脏生物标志物对评估肝类器官芯片模型保真度至关重要,为衡量模型真实状态提供有价值的指导,同时也是评估 DILI 的指标。白蛋白^[48]、尿素^[43]和 CYP 酶^[49]均为肝脏特异性生物标志物,反映肝脏的健康状态。白蛋白由肝脏合成,白蛋白合成减少直接体现肝脏合成功能受损。尿素水平可以表征具有代谢活力的肝细胞线粒体活性^[43]。CYP 酶作为肝脏代谢能力的重要生物标志物,其变化不仅反映了内源性物质合成与降解的能力,还反映了药物对肝脏代谢能力的影响^[49-50]。在 DILI 的评估中,谷丙转氨酶与谷草转氨酶被视为肝细胞型 DILI 的特异性指标,而谷氨酰转氨酶、碱性磷酸酶、总胆红素及直接胆红素则是胆汁淤积型 DILI 的特异性指标,这些指标与临床诊断标准契合,共同揭示了不同类型 DILI 中肝脏的损伤状态^[51]。DILI 的发生机制复杂多样,包括: 1) 反应性代谢物引发的直接毒性; 2) 线粒体功能受损; 3) 胆盐输出泵 (bile salt export pump, BSEP) 抑制; 4) 免疫介导病理机制。基于上述机制,可针对性选择特异性相关标志物指标,包括: 1) 直接毒性的反应性代谢物: 与细胞活性相关的三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 和细胞凋亡标志物等以及与脂质过氧化产物相关的脂质堆积和谷胱甘肽; 2) 线粒体破坏: 与肝细胞线粒体功能相关的 ATP 以及活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平; 3) 胆盐输出泵抑制: 与胆汁酸合成/转运指标相关的胆汁酸和总胆红素; 免疫介导机制: 与炎症反应激活信号相关的白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等炎症因子^[52]。近年来,随着人工智能技术的不断发展,利用其对大数据和多模态数据的处理能力,纳入更多样化、更多种类以及更多形式的指标用于模型评估,如基于细胞图像数据^[53]和基因组学数据^[54]等,从而更加全面和精准地评估肝脏健康状态与 DILI 风险。

共识 5: 白蛋白、尿素和 CYP 酶等是反映肝脏健康状况的指标,ALT、AST、GGT 和 ALP 等则是反映肝脏损伤状态的指标,针对不同类型的 DILI 发生

机制,还存在一系列有代表性的指标可用于评价。在 DILI 的实验检测中,建议根据具体情况选择上述标志物的不同组合方案,用于反映 DILI 的真实状态。此外,随着医学图像和分子影像等多模态大模型的逐步发展,将进一步拓展检测指标的选择范围。

3.3 测试药物选择

2016 年,在“MIP-DILI”(Mechanism-based Integrated Prediction of Drug-Induced Liver Injury)项目的推动下,基于机制的 DILI 预测综合系统联盟编制了优先列表,将与生物过程相关的训练化合物列表列入其中,其中包含了与人类 DILI 高度相关的训练化合物^[55]。训练化合物的选择基于大量临床和实验证据,基于 DILI 的多种已知机制,包括但不限于反应性代谢物生成、线粒体功能破坏、胆盐输出泵抑制以及免疫介导的机制。这一综合系统旨在通过深入剖析这些训练化合物的毒性机制,改进并验证现有的以及新型的体内外测试系统,从而更准确地预测人类 DILI 的发生风险。

基于国际药品开发创新与质量协会 (Innovation and Quality Microphysiological Systems Affiliate, IQ MPS) 及其 MIP-DILI 项目的经验,遵循其指南开发的体外模型相较于不符合其指南的模型,在预测 DILI 方面表现出更高的预测有效性。通过这种方法,可以精心挑选出一组在种类、作用机制及 DILI 程度上均具有代表性的药物(见表 3)。此外,针对特定的实验目标或作用机制,例如肝药酶功能测试,我们可以进一步筛选出相应的特定化合物,以实现更为精准的靶向测试。为了进一步提升预测的广度和深度,可以综合考量多种来源文献推荐的药物清单,以及 DILIRank 数据库提供的药物肝脏毒性等级信息,从中选择出在种类、作用机制以及 DILI 程度上均具有代表性的药物(见表 3)。此外针对特定实验目的或作用机制,如针对肝药酶测试,可筛选出相应特定化合物,实现更为精准的靶向测试。

共识 6: 设计 DILI 实验测试药物时,以应尽可能纳入更多化合物种类、更多样化的作用机制以及覆盖更多不同 DILI 程度的药物,以确保测试的全面性和结果可比性。所建立的数据库应有利于促进与动物实验数据及临床观测结果进行对比,增强数据的可靠性和实用性。此外,相关结果将被用于训练、验证及优化人肝器官芯片的 DILI 预测模型,旨在为今后药物毒性预测提供坚实的数据和充分的实验依据,提升药物研发的安全和效率。

表 3 测试药物推荐清单

Tab.3 Recommended list of test drugs

药物名称	DILI 等级	作用机制
Nefazodone(奈法唑酮)	vMost-DILI-Concern	涉及反应代谢物生成、线粒体毒性、BSEP 抑制机制
Buspirone(丁螺环酮)	Ambiguous DILI-concern	MPS 推荐,与奈法唑酮匹配
Troglitazone(曲格列酮)	vMost-DILI-Concern	涉及反应代谢物生成、BSEP 抑制机制
Pioglitazone(吡格列酮)	vLess-DILI-Concern	MPS 推荐,与曲格列酮匹配
Trovaflaxacin(曲伐沙星)	vMost-DILI-Concern	涉及免疫介导机制
Levofloxacin(左氧氟沙星)	vMost-DILI-Concern	MPS 推荐,与曲伐沙星匹配
Tolcapone(托卡朋)	vMost-DILI-Concern	涉及反应代谢物生成、线粒体毒性、BSEP 抑制机制
Entacapone(恩他卡朋)	vLess-DILI-Concern	MPS 推荐,与托卡朋匹配
Digoxin(地高辛)	vNo-DILI-Concern	-
Hydrocortisone(氢化可的松)	vNo-DILI-Concern	-
Lidocaine(利多卡因)	vNo-DILI-Concern	-
Chlorpheniramine(扑尔敏)	vNo-DILI-Concern	-
Simvastatin(辛伐他汀)	vLess-DILI-Concern	免疫介导(特异质型)
Stavudine(司他夫定)	vMost-DILI-Concern	线粒体毒性
Zileuton(齐留顿)	vMost-DILI-Concern	涉及反应代谢物生成机制
Telithromycin(泰利霉素)	vMost-DILI-Concern	涉及胆汁酸改变机制
Benzbromarone(苯溴马隆)	vMost-DILI-Concern	线粒体功能障碍致 DILI 经典药物(刺激 ROS 升高)
Diclofenac(双氯芬酸)	vMost-DILI-Concern	涉及反应代谢物生成、线粒体功能紊乱、胆汁酸功能紊乱机制
Isoniazid(异烟肼)	vMost-DILI-Concern	线粒体功能障碍致 DILI 经典药物(刺激 ROS 升高)
Nimesulide(尼美舒利)	vMost-DILI-Concern	涉及反应代谢物生成机制
Acetaminophen (对乙酰氨基酚)	vMost-DILI-Concern	DILI 经典药物,涉及多种机制,为动物建模公认药物
Phenytoin(苯妥英)	vMost-DILI-Concern	可能由免疫反应介导
Flutamine(氟他胺)	vMost-DILI-Concern	动物实验支持其免疫介导机制
Paclitaxel(紫杉醇)	vLess-DILI-Concern	(细胞毒素类抗肿瘤药物) 超敏反应和急性直接肝损伤
Vinblastine(长春碱)	vNo-DILI-Concern	-
Cyclophosphamide(环磷酰胺)	vLess-DILI-Concern	(细胞毒素类抗肿瘤药物) 机制尚不清楚
Methotrexate(甲氨蝶呤)	vMost-DILI-Concern	(细胞毒素类抗肿瘤药物) 肝脏直接毒性
Doxubicin(多柔比星)	vLess-DILI-Concern	(细胞毒素类抗肿瘤药物) 肝脏直接毒性
Erlotinib(厄洛替尼)	vMost-DILI-Concern	免疫介导(靶向治疗-酪氨酸激酶抑制剂)
Gefitinib(吉非替尼)	vMost-DILI-Concern	免疫原性中间体的积累(抗肿瘤药物: 靶向治疗-EGFR 抑制剂)

3.4 预测效能要求

在使用人肝类器官芯片对以上药物进行肝损伤检测过程中,所检测出的结果将通过自建 DILI 预测模型进行深度分析,得到模型评价性能指标,包括灵敏度、特异度、精准度、准确度、F1 分数和 ROC 曲线下面积(area under curve, AUC) 等。

1) 灵敏度(sensitivity), 又称为真阳性率, 是指模型正确预测为阳性的样本数占实际阳性样本总数的比例, 是评估模型在检测真实阳性样本时的准确性。模型的灵敏度越高, 表明其能够正确预测出真实阳性样本的能力就越强。

2) 特异度(specificity), 定义为所有真实为阴性的样本中, 被模型正确预测为阴性的比例, 是评价分类模型性能的重要指标, 尤其是在处理类别不平衡的数据集时。当数据中阴性样本占比较大时, 模型的准确率可能会被阳性样本的预测效果所主导, 而特异度可以帮助评价模型在阴性样本中的

表现^[56-57]。

3) 精准度(precision), 定义为在所有被模型预测为阳性的样本中, 实际为阳性的样本数占比, 即被正确预测为阳性的概率, 用于评估模型的正确率。它反映了被模型预测为阳性结果的可靠性或“纯度”。精准度用于评估模型在预测为正类时的正确性。

4) 准确度(accuracy), 定义为所有被模型正确预测的样本数占总样本数的比例, 即模型对所有样本的预测准确率, 是衡量模型整体预测性能的一个重要指标。与之紧密相关的是精准度(precision), 两者都是评估分类模型性能的常用参数。然而, 当数据中阳性和阴性的比例不平衡时, 仅使用精准度和准确度作为评价指标可能会掩盖模型对少数类的预测效果, 因此需要结合其他指标进行综合评价, 以实现更为全面和准确的评价^[58]。

5) F1 分数(F1-score), 是精准率和召回率的调

和平均数,它综合了这两个指标,用于全面评估分类模型的预测精度。F1 值的范围在 0 到 1 之间,越接近 1 表示模型预测性能越好。

6) ROC 曲线 (receiver operating characteristic curve) 是一种图形化工具,描述了在不同分类阈值下真阳性率和假阳性率之间的动态关系。通过 ROC 曲线,可以直观地观察到模型在不同阈值下的性能表现,进而评估模型的分类能力。ROC 曲线越靠近左上角,表示模型的性能越好,因为它能在保持较低假阳性率的同时,实现较高的真阳性率。

7) ROC 曲线下面积 (area under curve, AUC) 用作衡量二元分类模型整体性能的一个综合指标。AUC 的取值范围介于 0.5 到 1 之间,其中, AUC 值越接近于 1,表示分类模型的性能越好,即模型在区分阳性与阴性时展现出了更高准确率。相反, AUC 值为 0.5 时,意味着模型的性能与随机猜测无异,不具备任何区分能力^[59]。

通过灵敏度和特异度可以评估模型在识别阳性和阴性样本的判断能力,灵敏度反映了模型正确识别阳性样本的能力,而特异度则衡量了模型正确识别阴性样本的能力。通过精准度可以从阳性结果角度判断模型预测能力,通过准确率、F1-Score 和 AUC 则提供了更为全面整体的视角来评估模型的预测能力。综上所述,通过多个维度的评估,全面而深入地了解模型的预测能力,从而证明人肝器官芯片的功能可靠性及优势。

3.5 肝器官芯片的局限性

目前,尽管肝器官芯片在生物医学研究中展现出巨大潜力,但它尚还不能完全取代传统的动物模型。虽然动物模型存在一定的成本,但肝器官芯片所需的复杂部件和制造技术同样面临不容忽视的成本问题。复杂性限制了肝器官芯片的大规模制造和普及,增加了操作培训成本,限制了高通量自动化的发展。同时,肝脏微阵列的生理模拟还存在着细胞来源是否与生理状态密切匹配的问题。因此,PHH 仍然是最佳肝细胞来源,微流控技术可以延长其体外活性时间,但供体数量有限。目前的趋势是用低成本的、高度分化的 iPSCs 取代 PHH^[60-61]。多能干细胞的分化特性也为个性化药物研究提供了便利。然而,使用 iPSCs 也带来了挑战,细胞分化过程复杂性、影响因素的多样性以及耗时长等特点,均需要通过实际操作中不断优化来降低操作的复杂性等。此外, iPSCs 衍生的细胞与天然肝细胞并不完全一致,其结构和功能需要进一

步成熟^[62]。尽管肝器官芯片可以模拟肝脏的一部分功能,但无法完全复制人体肝脏复杂的结构与功能。难以模拟肝脏的完整血管系统、血液流动以及复杂的免疫微环境,直接影响其在药物代谢和解毒以及胆汁生成等关键生理功能上的表现^[63-64]。因此,在推动肝器官芯片技术发展的同时,仍需保持对其局限性的清醒认识,并不断探索新的解决方案以提升其模拟的真实性和准确性。

对于肝器官芯片这种功能复杂的新技术来说,其很难与常用的显微镜成像方法相匹配。人工定位和操作器官芯片获取图像是可变的、耗时的且数据量有限^[65]。为了提升数据的数量与质量,引入半自动或自动成像以及定量软件是关键所在。但是,目前的自动成像技术尚需克服与肝器官芯片平台独特性不匹配问题,确保两者能够无缝对接。

目前许多成像方法仍与器官芯片不兼容,如全息光学流体显微镜,其分辨率不足,尚难以满足器官芯片平台对微观细节的精准捕捉需求^[66]。展望未来,肝器官芯片技术在药物开发领域的持续进步,需高度依赖于与实验室环境的良好相容性以及自动高通量筛选能力的实现。同时,不容忽视的是,肝器官芯片的制造在生产批次、实验室甚至同一组的制造商之间可能存在显著差异和不一致,其长期培养的稳定性及可重复性仍然是一个挑战。特别是涉及多器官芯片,不同的体外器官模型有不同的培养和制造技术。构建一个标准化的系统,有效整合各相关系统和元素以减少临床前药物试验中的不确定性因素。因此,致力于生产更可靠和一致的设备,不仅是提升肝器官芯片技术性能的关键,也是推动其商业化进程、增强市场可行性的必由之路。

肝器官芯片的发展仍处于验证阶段,要广泛应用于科研和临床,仍需要进行更多的研究和规范。

共识 7: 评估 DILI 肝器官芯片预测性能的关键指标包括灵敏度、特异度、精准度、准确度等,因此需要对构建的肝器官芯片系统逐步验证完善,旨在确保芯片的可重复性、稳定性及统一性,并进行临床 DILI 药物的分类预测,详尽阐述该芯片在预测药物性肝损伤方面的效能与优势,有力推动肝器官芯片技术在药物毒性预测领域的广泛认可与深入应用,为药物安全性评估提供更为精准与高效的解决方案。

4 小结

目前,用于 DILI 研究的大多数实验模型不能充

分反映人类生物学的复杂性,阻碍了准确预测临床前 DILI 发展的能力,因此非常有必要建立用于 DILI 临床前评估的改进模型^[67]。人肝器官芯片可能有助于更早地识别毒性,其作为一种新型的体外拟人化模型进行 DILI 检测得到全球专家的高度关注和探索应用。

本共识聚焦于药物性肝损伤评价的人肝器官芯片技术,从生物学、工程学和肝损伤预测性能等方面提出规范建议。未来将紧密结合临床实践,不断积累循证医学证据,逐步对本共识进行完善修订,旨在形成相应的技术标准和临床指南。

随着人肝器官芯片研究的不断深入和改进,其在 DILI 中的应用前景会越来越广泛,通过引入生物变异和复杂性,以便描绘机制和预测相关的 DILI 信号,从而构建与人类实验结果更为接近或更高一致性的实验模型。此外,通过耦合非侵入性成像、多组学方法和概念框架来组织作用模式和机制,结合微生理系统和其他新兴的 2D 和 3D 多细胞平台,增强对 DILI 病理生理学理解,以解决药物开发中的预测难题^[68]。未来,人肝器官芯片与其他生物转化技术(如开发高分化 iPSC 来源的肝组织等)相辅相成应用,也将提高 DILI 预测的准确性,并发现 DILI 干预及治疗的新靶点。

编写专家组成员

责任作者:

顾忠泽 东南大学

张娟 东南大学

江苏运动健康研究院

专家组成员:(按姓氏拼音排名不分先后)

鲍恺军 先为达生物

陈璞 武汉大学

陈早早 东南大学

程张军 东南大学附属中大医院

郭家彬 解放军疾病预防控制中心

胡蕴慧 天士力国际基因网络药物创新中心

黄棣 太原理工大学

李晨钟 香港中文大学

梁戈玉 东南大学

吕凌 徐州医科大学

马少华 清华大学

毛红菊 中国科学院上海微系统与信息技术研究所

茅益民 上海交通大学附属仁济医院

浦跃朴 东南大学

祁小龙 东南大学附属中大医院

屈莉红 上海市东方医院

滕皋军 东南大学附属中大医院

王尚君 南京市计量监督检测院

王文佳 天士力国际基因网络药物创新中心

熊春阳 北京大学

严笑鹏 江苏运动健康研究院

杨杏芬 南方医科大学

杨应成 海军军医大学第三附属医院

郑付印 北京航空航天大学

朱宝立 江苏省疾病预防控制中心

朱江波 海军军医大学

参考文献

- [1] Ramachandran P, Matchett KP, Dobie R, et al. Single-cell technologies in hepatology: new insights into liver biology and disease pathogenesis[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(8): 457-472.
- [2] Vulto P, Joore J. Adoption of organ-on-chip platforms by the pharmaceutical industry[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(12): 961-962.
- [3] Marx U. Biology-inspired microphysiological systems to advance medicines for patient benefit and animal welfare[J]. *ALTEX*, 2020, 37(3): 365-394.
- [4] Chalasani NP, Maddur H, Russo MW, et al; Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. ACG clinical guideline: diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury[J]. *Am J Gastroenterol*, 2021, 116(5): 878-898.
- [5] Björnsson ES. Epidemiology and risk factors for idiosyncratic drug-induced liver injury[J]. *Semin Liver Dis*, 2014, 34(2): 115-122.
- [6] Shen T, Liu Y, Shang J, et al. Incidence and etiology of drug-induced liver injury in mainland China[J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(8): 2230-2241.
- [7] Lammert C, Björnsson E, Niklasson A, et al. Oral medications with significant hepatic metabolism at higher risk for hepatic adverse events[J]. *Hepatology*, 2010, 51(2): 615-620.
- [8] Yu YC, Mao YM, Chen CW, et al. CSH guidelines for the diagnosis and treatment of drug-induced liver injury[J]. *Hepatol Int*, 2017, 11(3): 221-241.
- [9] Fontana RJ, Björnsson ES, Reddy R, et al. The evolving profile of idiosyncratic drug-induced liver injury[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2023, 21(8): 2088-2099.
- [10] 中国医药生物技术协会药物性肝损伤防治技术专业委员会, 中华医学会肝病学会分会药物性肝病学组. 中国药物性肝损伤诊治指南(2023年版)[J]. *中华肝脏病杂志*, 2023, 31(4):

- 355-384.
- [11] Fontana RJ, Liou I, Reuben A, et al. AASLD practice guidance on drug, herbal, and dietary supplement-induced liver injury [J]. *Hepatology*, 2023, 77(3): 1036-1065.
- [12] European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: drug-induced liver injury [J]. *J Hepatol*, 2019, 70(6): 1222-1261.
- [13] Hayashi PH, Fontana RJ. Clinical features, diagnosis, and natural history of drug-induced liver injury [J]. *Semin Liver Dis*, 2014, 34(2): 134-144.
- [14] Robles-Diaz M, Lucena MI, Kaplowitz N, et al. Use of Hy's law and a new composite algorithm to predict acute liver failure in patients with drug-induced liver injury [J]. *Gastroenterology*, 2014, 147(1): 109-118.
- [15] Low LA, Mummery C, Berridge BR, et al. Organs-on-chips: into the next decade [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(5): 345-361.
- [16] Vega JMH, Hong HJ, Loutharback K, et al. A microfluidic device for long-term maintenance of organotypic liver cultures [J]. *Adv Mater Technol*, 2023, 8(2): 2201121.
- [17] Ronaldson-Bouchard K, Vunjak-Novakovic G. Organs on-a-chip: a fast track for engineered human tissues in drug development [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(3): 310-324.
- [18] Giobbe GG, Michielin F, Luni C, et al. Functional differentiation of human pluripotent stem cells on a chip [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(7): 637-640.
- [19] Dianat N, Dubois-Pot-Schneider H, Steichen C, et al. Generation of functional cholangiocyte-like cells from human pluripotent stem cells and HepaRG cells [J]. *Hepatology*, 2014, 60(2): 700-714.
- [20] Broutier L, Mastrogianni G, Versteegen MM, et al. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening [J]. *Nat Med*, 2017, 23(12): 1424-1435.
- [21] Beckwith CH, Clark AM, Wheeler S, et al. Liver organ on a chip [J]. *Exp Cell Res*, 2018, 363(1): 15-25.
- [22] Zeilinger K, Freyer N, Damm G, et al. Cell sources for *in vitro* human liver cell culture models [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2016, 241(15): 1684-1698.
- [23] Donato MT, Tolosa L. Stem-cell derived hepatocyte-like cells for the assessment of drug-induced liver injury [J]. *Differentiation*, 2019, 106: 15-22.
- [24] Donato MT, Jover R, Gómez-Lechón MJ. Hepatic cell lines for drug hepatotoxicity testing: limitations and strategies to upgrade their metabolic competence by gene engineering [J]. *Curr Drug Metab*, 2013, 14(9): 946-968.
- [25] Deng J, Wei W, Chen Z, et al. Engineered liver-on-a-chip platform to mimic liver functions and its biomedical applications: a review [J]. *Micromachines (Basel)*, 2019, 10(10): 676.
- [26] Donato MT, Lahoz A, Castell JV, et al. Cell lines: a tool for *in vitro* drug metabolism studies [J]. *Curr Drug Metab*, 2008, 9(1): 1-11.
- [27] Takayama K, Inamura M, Kawabata K, et al. Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 α transduction [J]. *Mol Ther*, 2012, 20(1): 127-137.
- [28] Gómez-Lechón MJ, Tolosa L, Conde I, et al. Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2014, 10(11): 1553-1568.
- [29] Ware BR, Berger DR, Khetani SR. Prediction of drug-induced liver injury in micropatterned co-cultures containing iPSC-derived human hepatocytes [J]. *Toxicol Sci*, 2015, 145(2): 252-262.
- [30] Gough A, Soto-Gutierrez A, Verneti L, et al. Human biomimetic liver microphysiology systems in drug development and precision medicine [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(4): 252-268.
- [31] Xu L, Hui AY, Albanis E, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis [J]. *Gut*, 2005, 54(1): 142-151.
- [32] Khazali AS, Clark AM, Wells A. A pathway to personalizing therapy for metastases using liver-on-a-chip platforms [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2017, 13(3): 364-380.
- [33] Kidambi S, Sheng L, Yarmush ML, et al. Patterned co-culture of primary hepatocytes and fibroblasts using polyelectrolyte multilayer templates [J]. *Macromol Biosci*, 2007, 7(3): 344-353.
- [34] Ma C, Zhao L, Zhou EM, et al. On-chip construction of liver lobule-like microtissue and its application for adverse drug reaction assay [J]. *Anal Chem*, 2016, 88(3): 1719-1727.
- [35] Ma LD, Wang YT, Wang JR, et al. Design and fabrication of a liver-on-a-chip platform for convenient, highly efficient, and safe *in situ* perfusion culture of 3D hepatic spheroids [J]. *Lab Chip*, 2018, 18(17): 2547-2562.
- [36] Cui X, Hartanto Y, Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation [J]. *J R Soc Interface*, 2017, 14(127): 20160877.
- [37] Fang Y, Eglén RM. Three-dimensional cell cultures in drug discovery and development [J]. *SLAS Discov*, 2017, 22(5): 456-472.
- [38] Yu F, Choudhury D. Microfluidic bioprinting for organ-on-a-chip models [J]. *Drug Discov Today*, 2019, 24(6): 1248-1257.
- [39] Strauss AW, Bennett CD, Donohue AM, et al. Rat liver pre-proalbumin: complete amino acid sequence of the pre-piece. Analysis of the direct translation product of albumin messenger RNA [J]. *J Biol Chem*, 1977, 252(19): 6846-6855.
- [40] Judah JD, Quinn PS. Calcium ion-dependent vesicle fusion in the conversion of proalbumin to albumin [J]. *Nature*, 1978, 271(5643): 384-385.
- [41] Morris SM Jr. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism [J]. *Annu Rev Nutr*, 2002, 22: 87-105.
- [42] Rodríguez-Antona C, Donato MT, Boobis A, et al. Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells [J]. *Xenobiotica*, 2002, 32(6): 505-520.

- [43] Baudy AR , Otieno MA , Hewitt P , et al. Liver microphysiological systems development guidelines for safety risk assessment in the pharmaceutical industry [J]. *Lab Chip* , 2020 , 20(2) : 215-225.
- [44] Leung CM , de Haan P , Ronaldson-Bouchard K , et al. A guide to the organ-on-a-chip [J]. *Nat Rev Methods Primers* , 2022 , 2(1) : 1-29.
- [45] Ehrlich A , Duche D , Ouedraogo G , et al. Challenges and opportunities in the design of liver-on-chip microdevices [J]. *Annu Rev Biomed Eng* , 2019 , 21: 219-239.
- [46] Hartung T. Toxicology for the twenty-first century [J]. *Nature* , 2009 , 460: 208-212.
- [47] Li M , Izpisua Belmonte JC. Organoids – preclinical models of human disease [J]. *N Engl J Med* , 2019 , 380(6) : 569-579.
- [48] Riahi R , Shaegh SAM , Ghaderi M , et al. Automated microfluidic platform of bead-based electrochemical immunosensor integrated with bioreactor for continual monitoring of cell secreted biomarkers [J]. *Sci Rep* , 2016 , 6(1) : 24598.
- [49] Jang K , Otieno MA , Ronxhi J , et al. Reproducing human and cross-species drug toxicities using a liver-chip [J]. *Scie Trans Med* , 2019 , 11(517) : x5516.
- [50] Giobbe GG , Michielin F , Luni C , et al. Functional differentiation of human pluripotent stem cells on a chip [J]. *Nat Methods* , 2015 , 12(7) : 637-640.
- [51] Zhang Y , Gao H , Zhang Y , et al. Correlation between serum cytokines and clinicopathological features in patients with drug-induced liver injury [J]. *Front Pharmacol* , 2022 , 13: 1070802.
- [52] Zhang CJ , Meyer SR , O'Meara MJ , et al. A human liver organoid screening platform for DILI risk prediction [J]. *J Hepatol* , 2023 , 78(5) : 998-1006.
- [53] Xu JJ , Henstock PV , Dunn MC , et al. Cellular imaging predictions of clinical drug-induced liver injury [J]. *Toxicol Sci* , 2008 , 105(1) : 97-105.
- [54] Li T , Tong W , Roberts R , et al. Deep learning on high-throughput transcriptomics to predict drug-induced liver injury [J]. *Front Bioeng Biotechnol* , 2020 , 8: 562677.
- [55] Dragovic S , Vermeulen NP , Gerets HH , et al. Evidence-based selection of training compounds for use in the mechanism-based integrated prediction of drug-induced liver injury in man [J]. *Arch Toxicol* , 2016 , 90(12) : 2979-3003.
- [56] Deng X , Li M , Deng S , et al. Hybrid gene selection approach using XGBoost and multi-objective genetic algorithm for cancer classification [J]. *Med Biol Eng Comput* , 2022 , 60(3) : 663-681.
- [57] Ganaie MA , Tanveer M , Suganthan PN , et al. Oblique and rotation double random forest [J]. *Neural Netw* , 2022 , 153: 496-517.
- [58] Wang H , Shao Y , Zhou S , et al. Support vector machine classifier via L0/l1 soft-margin loss [J]. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell* , 2022 , 44(10) : 7253-7265.
- [59] Ding C , Bao TY , Huang HL. Quantum-inspired support vector machine [J]. *IEEE Trans Neural Netw Learn Syst* , 2022 , 33(12) : 7210-7222.
- [60] Wang Y , Wang H , Deng P , et al. *In situ* differentiation and generation of functional liver organoids from human iPSCs in a 3D perfusable chip system [J]. *Lab Chip* , 2018 , 18(23) : 3606-3616.
- [61] Fu J , Qiu H , Tan CS. Microfluidic liver-on-a-chip for preclinical drug discovery [J]. *Pharmaceutics* , 2023 , 15(4) : 1300.
- [62] Tu C , Chao BS , Wu JC. Strategies for Improving the Maturity of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes [J]. *Circ Res* , 2018 , 123(5) : 512-514.
- [63] Ronaldson-Bouchard K , Teles D , Yeager K , et al. A multi-organ chip with matured tissue niches linked by vascular flow [J]. *Nat Biomed Eng* , 2022 , 6(4) : 351-371.
- [64] Zhao XF , Jiang YH , Liu CL , et al. Organoid technology and clinical applications in digestive system cancer [J]. *Engineering* , 2022 , 9(2) : 123-130.
- [65] Lohasz C , Loretan J , Sterker D , et al. A microphysiological cell-culturing system for pharmacokinetic drug exposure and high-resolution imaging of arrays of 3D microtissues [J]. *Front Pharmacol* , 2021 , 12: 785851.
- [66] Buchanan BC , Yoon JY. Microscopic imaging methods for organ-on-a-chip platforms [J]. *Micromachines (Basel)* , 2022 , 13(2) : 328.
- [67] Ewart L , Apostolou A , Briggs SA , et al. Performance assessment and economic analysis of a human liver-chip for predictive toxicology [J]. *Commun Med (Lond)* , 2022 , 2(1) : 154.
- [68] Fernandez-Checa JC , Bagnaninchi P , Ye H , et al. Advanced preclinical models for evaluation of drug-induced liver injury—consensus statement by the European Drug-Induced Liver Injury Network [PRO-EURO-DILI-NET] [J]. *J Hepatol* , 2021 , 75(4) : 935-959.