

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2024-064

肝器官芯片在生物医学研究中的应用进展

陈汐玥^{1,2}, 王亚清^{3,4}, 包芳^{3,4}, 秦建华¹

(¹ 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023; ² 中国科学院大学, 北京 100049; ³ 中国科学技术大学, 安徽 合肥 230026; ⁴ 中国科学技术大学苏州高等研究院, 江苏 苏州 215123)

摘要: 肝脏具有复杂结构和多种功能, 包括血糖调控、蛋白合成、解毒和药物代谢等, 在维持人体正常生理活动中起着重要作用。传统的二维细胞培养和动物模型已被广泛用于肝脏生理或疾病研究, 但它们在反映人体组织真实微环境和对药物反应等方面仍存在一定局限。因此, 建立高仿真度肝脏体外模型对于肝病研究、药效与毒性评价至关重要。本文概述了传统肝脏体外模型在实现近生理复杂环境模拟、肝组织特异性功能准确复现等方面的局限性, 总结了以器官芯片为代表的新型肝脏体外模型的设计策略、技术特点及其在生物医学领域的研究进展。文中重点介绍了肝器官芯片仿生构筑和实现肝组织微环境模拟的关键要素, 包括多细胞组分、肝窦/肝小叶结构、生化因子梯度和流体因素等, 并对未来结合其他先进手段(如类器官、生物材料和基因编辑等)等, 建立高度生理相关性的肝器官芯片和微生理系统的发展前景予以展望。

关键词: 肝脏; 器官芯片; 类器官; 疾病研究; 药物评价

中图分类号: Q816 文献标志码: A

Advances in the application of liver on a chip in biomedical research

CHEN Xiyue^{1,2}, WANG Yaqing^{3,4}, BAO Fang^{3,4}, QIN Jianhua¹

(¹Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, Liaoning, China; ²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ³University of Science and Technology of China, Hefei 230026, Anhui, China; ⁴Suzhou Institute for Advanced Research, University of Science and Technology of China, Suzhou 215123, Jiangsu, China)

Abstract: The liver plays an important role in maintaining normal physiological activities of the human body. It has a complex structure and multiple functions, including blood glucose regulation, protein synthesis, detoxification and drug metabolism. Although traditional two-dimensional cell culture and animal models have been used to study liver physiology or pathology, there are still some limitations in truly reflecting the microenvironment of human liver and its response to drugs. The development of liver models in vitro is essential for disease research and effective drug testing. Organ-on-a-chip is a groundbreaking technology that has emerged in recent years by merging engineering and biological approaches. It can replicate the essential structural and functional features of human tissues and organs *in*

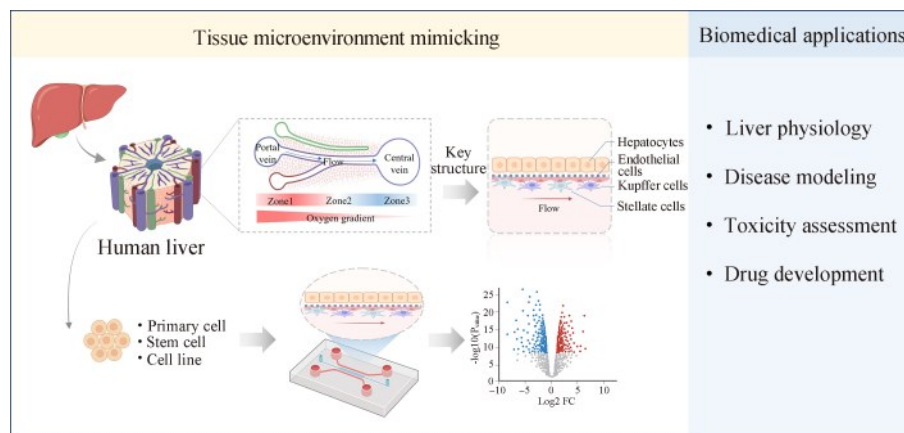
收稿日期: 2024-08-16 修回日期: 2024-08-30

基金项目: 国家自然科学基金(32171406, 32201184); 国家重点研发计划(2022YFA1104700, 2022YFA1205000)

引用本文: 陈汐玥, 王亚清, 包芳, 秦建华. 肝器官芯片在生物医学研究中的应用进展[J]. 合成生物学, 2024, 5(4): 813-830

Citation: CHEN Xiyue, WANG Yaqing, BAO Fang, QIN Jianhua. Advances in the application of liver on a chip in biomedical research [J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(4): 813-830

vitro. Recently, *in vitro* liver tissue models created with organ chips have shown an impressive ability to closely mimic the liver tissue microenvironment and offer high-throughput capabilities. These models have been extensively applied in liver regenerative medicine, disease research, and drug testing, highlighting their significant potential in the biomedical field. Therefore, in this paper, we provide a comprehensive overview of the limitations inherent in traditional liver *in vitro* models, particularly in their ability to replicate complex physiological microenvironments and accurately reproduce liver-specific functions. It delineates the design strategies, technical characteristics, and research advancements associated with novel liver *in vitro* models, with a particular emphasis on organ-on-a-chip technologies. The discussion focuses on the key elements crucial for the biomimetic construction of liver organ-on-a-chip systems and the simulation of liver tissue microenvironments. These elements include the integration of multicellular components, the replication of liver sinusoid and lobule structures, the establishment of biochemical factor gradients, and the incorporation of fluid dynamics. Moreover, it provides an outlook on the future development of highly physiologically relevant liver organ-on-a-chip and microphysiological systems, considering the integration of advanced techniques such as organoids, biomaterials, and gene editing.



Keywords: human liver; organ-on-a-chip; organoid; disease modeling; drug testing

肝脏是人体内最大的实质性器官，具有复杂的微结构和功能，包括糖原和白蛋白的生物合成、能量代谢、药物转化、解毒和胆汁分泌等。由慢性疾病或药物的不良反应引起的肝损伤严重威胁人类健康，其中药物性肝损伤（DILI）是新药临床试验失败和撤市的主要原因。目前，肝脏疾病研究和临床前药物测试大多依赖于传统二维（2D）细胞培养体系和动物模型，但仍存在一定局限。2D细胞培养通常与体内环境差异巨大，包括缺乏细胞-细胞相互作用、难以再现肝组织的复杂微结构特征。动物模型常用于肝功能和药物毒性测试，但是在药物代谢途径和毒性敏感性等方面存在显著的物种差异性，往往不能真实地模拟人体内药物毒性的响应和分子机制。因此，迫切需要开发

和建立新型肝脏模型，以反映人体肝脏微环境特征以及对药物等外界刺激的真实响应。

器官芯片是近年来发展起来的一门前沿交叉技术，它将工程学和生物学策略相结合，可在体外模拟人体组织器官的关键结构和功能特点，在生物学研究、疾病建模和药物评价等领域具有重要应用潜力^[1-6]。器官芯片能够通过控制生物物理和生物化学的时空参数（如流体剪切力、因子浓度梯度、牵张力、循环应变力、细胞-细胞/基质的相互作用等）来模拟组织细胞微环境，预测人体对毒素、病原体 and 药物等不同刺激产生的复杂反应。

近年来，不同类型的器官芯片相继出现。其中，肝芯片被用来模拟肝组织关键结构和功能单

元^[7-9]，在研究复杂的生物学过程、解析疾病机制以及评估药物代谢和毒性等方面，具有广泛应用前景。本综述重点介绍了近年来肝芯片模型的构建策略和关键要素，总结了肝芯片在肝脏疾病研究和药物评价中的研究进展，讨论了现有肝芯片模型面临的挑战和潜在解决方案，并对未来开发先进的肝芯片模型系统及其在生物医学领域的应用前景予以展望。

1 人体肝组织结构和功能

肝脏具有复杂的微结构，肝小叶是肝脏的基本结构和功能单元，由中央静脉、肝板结构、肝血窦和胆小管共同组成，肝细胞围绕中央静脉呈放射状分布（图1）。在每个小叶内相互连接的肝细胞板之间有血管窦，其中不连续的、有孔的肝窦内皮细胞（LSEC）被肝细胞包围。LSEC与肝细胞之间形成窦周间隙（Disse间隙），其中充满了血液，促进了肝细胞与血液之间进行物质交换。此外，肝脏含有多种细胞类型，包括肝实质细胞和非实质细胞（如胆管细胞、LSEC、Kupffer细胞和肝星状细胞等）。肝细胞是高度分化的上皮细胞，呈菱形，高度极化，是肝组织的主要成分^[10]。非实质细胞约占肝细胞总数的40%，在维持组织结构、肝细胞表型以及调节肝脏对代谢和毒性刺激的反应方面发挥重要作用。LSEC是主要的非实质细胞，它在肝窦壁形成管状结构，以便血流和肝细胞之间进行物质交换^[11]。肝星状细胞是另一

种非实质细胞，其位于窦周间隙内并帮助储存维生素A和脂滴，是肝脏主要的胶原生成细胞，在响应损伤或疾病引起的胶原沉积中起重要作用^[12]。Kupffer细胞是位于肝脏的窦周间隙内的巨噬细胞，其主要功能是吞噬外源性物质、毒素和颗粒，并产生细胞因子等调节细胞间信号传导^[13]。胆管上皮细胞或胆管细胞构成肝内外胆管系统。胆管细胞通过分泌和吸收离子、胆汁酸、氨基酸和葡萄糖参与胆管修饰。肝细胞和胆管细胞是从同一双潜能肝祖细胞发育而来，这两种细胞是维持正常肝功能不可或缺的，是体外构建肝模型的重要组成部分。

2 仿生肝芯片构筑的关键要素

鉴于肝脏复杂的结构和功能，开发建立能够模拟肝组织微环境的体外肝模型是研究肝脏特异性生理和病理特征的先决条件，可有效弥补传统模型的一些局限。器官芯片技术为体外仿生肝模型的构筑以及肝脏生理学和病理学研究提供了新的策略和思路。通过整合工程学和生物学策略构筑肝芯片，模拟肝组织微环境因素，包括肝脏3D结构、多细胞相互作用、动态流体、因子/氧梯度和血管化等，可概述肝脏的关键结构和功能特征^[14-19]。

2.1 细胞来源

肝芯片构建所用的细胞来源通常包括人原代

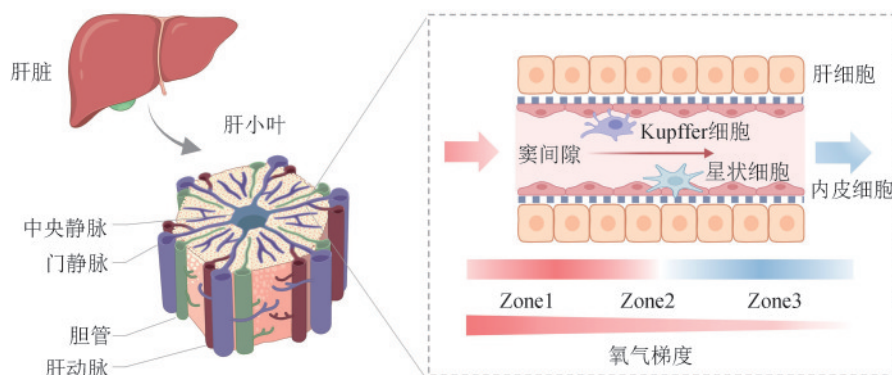


图1 人体肝组织结构示意图

(图形用BioRender制作)

Fig. 1 Schematic diagram of human liver

(This figure was created with BioRender.com)

肝细胞、永生化肝细胞系或癌细胞^[20-22]。肿瘤细胞系如HepG2和hepaRG等应用广泛，HepG2细胞是永生化的人类肝癌细胞，但它们表现出异常的基因谱和肝特异功能^[23-24]。原代肝细胞具有肝组织特异功能，但细胞来源有限，且在体外不易长期存活和增殖，容易发生去分化，其应用受到限制^[25-26]。随着干细胞领域的发展，人诱导多能干细胞(iPSC)被认为是构建人肝脏体外模型的有价值的细胞来源，它可以无限供应并定向分化成特异的细胞类型^[27-30]。在特定的诱导因子(如Activin A, HGF, FGF2, OSM等)条件下，PSC逐步向内胚层、前肠内胚层和肝前体细胞方向分化，进一步分化为肝实质细胞或胆管细胞^[31-34]。与HepG2细胞相比，iPSC衍生的肝细胞可以在体外保留肝细胞更准确的代谢特征，可通过基因编辑手段构造遗传病、罕见病模型，从而更好地了解疾病特征或进行药物筛选。例如，在Banaciyan等^[35]构建的肝小叶模型中，与HepG2细胞相比，iPSC细胞显示出显著增加的肝脏代谢标志物(如白蛋白、尿素和胆汁分泌)表达，以及胆管网络的生成。近年来，干细胞衍生的肝类器官作为一种新型的体外肝模型，具有器官特异的多细胞组成(包含胆管和肝细胞等)和优秀的肝脏代谢和蛋白合成等功能^[36-40]，为肝脏发育学研究、肝病机制研究、药物开发及再生医学等提供了一个有价值的平台。与2D细胞培养相比，肝类器官具有3D结构和更成熟的组织功能，为在多细胞水平研究肝组织发育和形态发生提供了可能性。

肝脏中除了肝实质细胞，还有一些关键的细胞类型，如LSEC、Kupffer细胞、星状细胞和胆管细胞等对肝组织的形态发生和功能起到重要作用。为了能在体外长期培养中维持肝组织功能，研究人员通过多种组织工程方法引入多类非实质细胞，进一步调节和增强肝细胞的功能，如逐层培养^[41]、非实质细胞共培养^[42]、多孔膜屏障结构^[43]、三明治样和细胞外基质(ECM)层培养^[44]。器官芯片可以通过设计不同的培养通道或微结构实现肝细胞与其他类型细胞的共培养和相互作用，以更准确地模拟肝组织结构和特异性功能。多项研究表明，肝细胞和非实质细胞的共培养体系显著改善了肝功能^[45-46]。此外，不同来源的细胞表型不尽相

同，对细胞功能的影响也较大，对于非实质细胞如内皮细胞的选择也应予以考虑。例如，与脐静脉内皮细胞(HUVEC)相比，LSEC具有更高的渗透性，因为它们具有大而丰富的窗孔结构，有利于肝细胞和内皮细胞的信息交流。

尽管在获取功能近似的体外肝细胞模型上取得了显著的进步，但是由于缺失体内相似组织微环境和生物物理线索，在体外维持肝组织特异的生物学特性和功能仍是目前体外构建仿生肝模型的难点之一。

2.2 肝组织微环境

2.2.1 肝窦/肝小叶结构

人肝脏执行广泛的生物学功能，这些功能与肝脏结构紧密联系。肝脏的主要组成部分是肝小叶，其外观呈六边形结构，其中肝细胞围绕中央静脉呈放射状分布，并由血管内皮细胞隔开。每个小叶的外围包含3~6个门脉三联管(由肝动脉、肝门静脉和胆管组成)，位于六边形结构的顶点，它们的特点是血液从六个角向中心集中，而胆汁从中心向外流动。体外重建与体内肝小叶结构相似的几何形状有利于更好地理解肝组织的结构特征和多细胞相互作用。器官芯片可以控制不同类型细胞群的空间排列进行细胞图案化，模拟肝脏微结构，再现肝小叶结构。

肝窦是相邻肝板之间的腔隙，具有较强的通透性，有利于肝细胞和血流之间进行物质交换，促进营养物质转运、吸收和肝细胞解毒功能。肝窦将肝细胞和LSEC分隔开，肝星状细胞和ECM填补了肝细胞和LSEC之间的空隙，Kupffer细胞以游离的形式动态参与肝脏免疫调节。最常见的模拟肝窦微环境的策略是利用多孔膜将芯片装置的上下腔室分隔开，模拟组织界面屏障。具体而言，将不同类型的细胞(如肝细胞、内皮细胞、星状细胞、Kupffer细胞等)接种在不同腔室中，并施加流体刺激模拟血流环境，从而模拟肝窦结构。

2.2.2 生化因子与氧气梯度

肝腺泡的分区特征和氧梯度是肝芯片模型构筑的基本方面^[20, 47]。肝腺泡是肝内微循环的最小

结构和功能单位，在两个门静脉三联征和两个中央静脉之间。按血流方向，肝腺泡可分为3个功能区带，存在营养物质、激素和氧的浓度梯度。在门静脉三联的周围区域（I区带），肝细胞获得充分的血供，氧和营养物质的浓度最高，代谢和分裂增殖能力均较强。接近中央静脉的区域（III区带）氧和营养物质的浓度降低，肝细胞的增殖和再生能力较弱，受不利因素影响后发生损伤和坏死的概率更高，常首先出现形态改变。器官芯片的主要优势之一是可以精确控制氧气和因子的浓度梯度，再现体内肝脏的分区微环境，具有较高的稳定性和重现性。通常不同网格构型的芯片可以用于流体分流和汇合，实现浓度梯度的生成和控制。器官芯片还可通过集成生物传感进行在线检测，例如检测氧浓度或细胞因子。Shih等^[48]建立了一种肝芯片，可模拟肝腺泡的梯度微环境。芯片包含顶部和底部的两个流体通道，以及中间的几个腺泡样腔室。氧和可溶性因子在细胞培养室中产生非线性浓度梯度。靠近顶部通道的区域暴露于较高的氧和较低的因子浓度，类似于肝腺泡的I区，高流体剪切力导致了I区细胞死亡率增加。而靠近底部流体通道的静脉周围区域暴露于较低的氧浓度，模拟了肝小叶的第3区。与I区不同，3区受剪切力影响较小，氧扩散交换速率较低，而可溶性因子和代谢废物在该区停留时间较长。除了通过控制微流体驱动产生因子浓度梯度，也可将ECM或水凝胶结合到芯片中促使细胞因子在基质胶中扩散，产生因子浓度梯度，导向肝细胞的排列和分布，并支持多种肝细胞类型的3D培养以及自组织形成生理相关结构。

2.2.3 血管化

肝脏内分布着致密的血管网络，丰富的血流环境为肝脏功能的正常维持提供了保障。器官芯片可通过精确控制微流体实现组织细胞的动态培养，模拟体内动态细胞微环境。通常使用注射泵灌注流体，实现在一定流量范围内的精确灌注，或利用芯片通道内液体的高度差驱动流体灌注。这不仅有利于充分的营养物质交换，促进组织细胞的长期存活和功能维持，还可研究不同类型细胞对剪切应力的反应。Hegde等^[49]设计了一种含有多孔膜的双层肝芯片体系，在底部的腔室中，

将原代大鼠肝细胞接种在胶原夹心结构中培养，以维持细胞的形态、极性和功能，在膜上层施加流体刺激模拟血流环境。结果显示动态培养的肝细胞表现出更高的白蛋白和尿素分泌功能，可诱导细胞色素P450 1A1活性，显示出连接良好的细胞网络，并形成胆小管。另外，肝脏的形态发生依赖于肝细胞、周围间质和血管内皮等多种细胞间的相互作用和复杂信号的调节^[50]。尽管已有研究报道血管化肝类器官可通过肝前体细胞、间充质干细胞和内皮细胞自组装构建形成^[51]，但在体外构建含有可灌通血管网的肝组织模型仍面临挑战。利用器官芯片策略有望解决这一难题。目前具有血管生成和血管功能的多种芯片模型被创建，通常是由ECM和血管内皮细胞共同组成功能化的血管通道。血管网结构对于工程化肝芯片模型的构建具有重要意义。Zhang等^[52]开发了一种可降解的芯片血管支架，使用合成水凝胶通过冲压技术制作3D支架，能够将复杂微通道网络嵌入其中。在血管通道管腔内培养内皮细胞，建立了稳定、可渗透的血管网络。进一步将实质细胞包裹于水凝胶中，进行血管网结构与多种实质组织的重构和组装，实现了血管化肝和心肌组织的构建。此外，Fritschen等^[53]将生物打印技术与器官芯片结合，建立了高通量、自动化的芯片打印平台，并实现了多细胞和血管化的肝癌模型的构建，该模型具有肝组织特异性功能和稳定的血管网络形成。

3 不同类型的肝芯片

肝芯片作为一种重要的肝脏体外模型，可通过模拟细胞微环境因素如机械流体、生化因子、细胞间相互作用等构建肝脏生理微环境，实现具有生理相关性的肝组织结构和功能重建。近年来，多种类型的肝芯片模型建立起来，如肝小叶芯片、肝窦芯片、胆管芯片和肝类器官芯片，模拟了肝组织的结构和功能特点。这些肝芯片模型对肝脏再生医学、疾病研究和药物测试等方面都具有重要应用价值。

3.1 肝小叶芯片

为了在体外模拟肝小叶的微结构,研究人员创建了特定微尺度的器官芯片系统,优化肝细胞培养条件,并进行多种细胞类型的共培养。例如, Ho等^[54]利用介电泳产生的放射状电场梯度诱导肝细胞和内皮细胞沿电场方向有序排列,模拟肝小叶六边形结构。结果证明细胞图案化可有效增强肝细胞的CYP1A1酶活性,有利于维持肝脏的药物代谢。此外,由于肝脏代谢功能在很大程度上受肝窦血流的影响,因此结合流体可以有效提高肝模型的功能和可重复性。通过适当的流体通道设计,可以在施加最小剪切力的情况下实现对肝细胞稳定的流体灌注。体内肝细胞在肝小叶中呈放射状排布,由低营养含量的肝动脉和高营养含量的肝门静脉提供双重血液^[55-56]。最近,肝小叶芯片的设计也结合了其血液循环的生理特征,包括混合的双重血液流入(肝动脉和门静脉)以及通过中央静脉流出。例如, Banaeiyan等^[35]利用器官芯片培养HepG2细胞和hiPSC来源的肝细胞,模拟生理的肝小叶、肝窦和门静脉结构,其中,六边形样结构和流体通道再现了肝脏血液循环的对流-扩散过程。Du等^[57]建立了肝小叶芯片,通过设计的肝门静脉和肝动脉实现双重供血,形成的肝组织与体内肝脏结构类似,进一步模拟了非酒精性脂肪肝病(NAFD)早期进展过程中单个肝小叶脂质分区的变化,该研究为肝脏相关疾病提供了一个有前景的平台。尽管肝小叶芯片构建已取得显著进展,但仍有改进空间,如可以整合肝窦结构、胆管结构,相互连接的肝板网络和肝结构分区等,以更好地模拟肝生理结构和功能。

3.2 肝窦芯片

肝窦芯片的构建策略与肝小叶芯片方法相似。可通过光刻技术设计不同的细胞培养腔室,这些腔室通过微小通道进行连接或通过多孔膜进行分隔,利用微流体的灌注培养模拟肝窦血流微环境。例如, Lee等^[58]设计构建了一种肝芯片,在含有内皮样屏障结构的微流控通道中培养原代大鼠和人肝细胞,建立肝窦模型,模拟肝窦微结构。芯片包含间隙微结构,间隙外侧通道可进行培养基

灌注,模拟内皮屏障,可防止流体直接流向肝细胞,同时促进营养物质和氧气的交换;内部腔室可培养大鼠和人原代肝细胞。Prodanov等^[59]设计了一种含有多孔膜的双层肝芯片系统,在膜上层接种内皮细胞EA.hy926和Kupffer细胞U937,底部通道接种单层原代人肝细胞,并将星状细胞LX-2与胶原混合接种在膜下层通道中,模拟肝窦间隙,该方式可以更有效地模拟肝细胞和非实质细胞间的相互作用。与静态培养的肝细胞相比,动态培养的肝细胞显示出持续较高的白蛋白和尿素合成。不同类型肝细胞之间的相互作用对维持肝组织的结构和功能至关重要。Rennert等^[60]建立了一种可灌注的夹膜芯片,将几种非实质细胞(内皮细胞、巨噬细胞和肝星状细胞)与肝细胞共培养,在动态培养条件下模拟肝窦组织。结果表明灌注培养可促进肝微绒毛结构的产生并显著增强肝细胞功能,此外该芯片还集成了生物传感器用于在线检测细胞耗氧量。虽然,目前已构建的肝芯片能通过工程学策略重现体外肝窦超微组织结构并对其施加微流体环境,提高了体外肝窦组织模型的仿生度,但对于体内肝窦组织而言,可灌注血管网和营养因子、氧气浓度梯度仍是影响肝窦组织微环境的重要因素,决定着不同区域肝窦组织不同的功能侧重。因而,如何实现血管化工程和更精确生化环境的控制是更新肝窦芯片设计策略所需要重点考虑的。

3.3 胆管芯片

在肝脏中,胆管上皮细胞或胆管细胞构成肝内外胆管系统。肝细胞分泌的胆汁通常积聚在胆管中,并通过胆管将胆汁酸输送到小肠。胆管细胞通过一个受激素、肽、核苷酸、神经递质和其他分子(包括胆汁酸)调节的复杂过程来修饰肝细胞来源的胆汁。然而,现有肝组织模型通常缺乏胆汁排泄系统,导致胆汁在细胞培养基或肝细胞中积累,对细胞造成毒性。因此,在肝组织体外功能重建中,获得具有膜极性和功能性的胆管结构是至关重要的。Nakao等^[61]设计了一种非对称形状的微流体细胞培养装置,在胶原包被的腔室中培养大鼠原代肝细胞,使接种的细胞排列成

两行,模拟肝板结构,并通过灌流培养,形成沿肝板分布的胆小管结构。在使用荧光素CDFDA示踪肝细胞重要转运蛋白MRP2的实验中,结果显示顶端标记物MRP2主要分布于细胞连接区域。这提示着形成的胆小管具有代谢活性和MRP2转运功能,并且具有与体内类似的极性结构。

胆管疾病是导致肝脏功能异常的重要病因之一,受到了许多肝芯片研究者的关注。通常,胆管上皮细胞的紧密连接完整性受损在胆管疾病的发病机制中起着重要作用^[62]。Du等^[63]建立了一种胆管芯片,通过将小鼠胆管细胞接种在胶原基质中,形成极化和紧密连接的3D胆管结构。该系统中由胆管细胞汇合形成的致密上皮单层能够重现胆管的屏障功能,并且具有初级纤毛的结构以及成熟的胆管细胞功能。该胆管芯片能够从顶端和基底侧评估胆管细胞功能,为体外研究胆管疾病提供了一个新的模型。Liu等^[64]利用生物打印建立了血管化的人胆管芯片。该芯片包含人胆管细胞、肝细胞和内皮细胞,实现了管状微结构的高度可控,模拟了胆管系统的多细胞微环境和血管-胆道间质界面,为研究病理条件下胆管-免疫细胞串扰提供有力工具。体外胆道模型系统通常缺乏天然肝脏中的可灌注的分支结构,影响了胆道的成熟。Smith等^[65]在芯片上建立了肝内胆管系统,模拟了胆道的形态发生和胆小管的形成[图2(a)]。该模型中,原代人胆管细胞在复合ECM中以Notch信号依赖的方式自组织形成分支胆管网络,并验证了ECM和胆道相关生长因子在参与胆道形态发生和胆小管形成方面的重要性。从工程化的角度来看,许多与肝窦相似的挑战也出现于芯片上胆管和肝内胆道系统的构建。

3.4 肝类器官芯片

肝类器官的细胞来源主要包括Lgr5⁺成体干细胞和PSC。其中,Lgr5⁺成体干细胞具有向肝细胞和胆管细胞双向分化的潜能。目前,已成功建立人和小鼠等啮齿类动物成体干细胞来源的肝类器官^[40, 66-68]。肝类器官可进一步用于疾病模型建立,药物筛选和毒性测试等应用。目前,已用类器官建立了多种体外肝病模型,包括肝脏纤维化模

型^[69]、肝脏遗传性疾病(如 α 1-抗胰蛋白酶缺乏和Alagille综合征)模型^[40, 70]以及病毒感染性肝炎模型^[71-72]。值得注意的是,现有肝类器官培养体系在基质均一性、组织微环境可控性、成熟度和高通量分析等方面仍面临很多挑战。将类器官与器官芯片工程技术整合,即类器官芯片,将有利于在体外构筑具有更高可信度和生理相关性的器官模型系统^[73-76]。它可提供多种组织微环境要素,包含多种细胞空间排布、动态3D培养、生化因子梯度和力学因素刺激等。作者团队设计了一种可灌注的微柱阵列芯片装置,实现了hiPSC来源拟胚体的高通量、可控产生,并在流体条件下促进拟胚体向内胚层和肝谱系原位分化,以及肝类器官形成。这些分化流程可在芯片上一体化整合,大大简化了类器官培养的烦琐操作。此外,发现机械流体有利于肝发育过程中的内胚层分化,从而促进肝谱系分化并提高肝特异性功能,如白蛋白分泌和CYP450酶活性。肝类器官芯片体系还可用于肝毒性药物测试(如对乙酰氨基酚等)^[77]。未来,肝类器官芯片可能会为肝免疫炎症、病毒感染等疾病研究、药物开发和个性化治疗提供新的技术平台。与病人来源的iPSC细胞相结合,可形成含致病基因的个体化的肝类器官体系;通过集成监测装置和高通量元素,有望实现临床前药物筛选、药效评价和毒性预测。另外,利用CRISPR-Cas9等基因编辑技术,将癌基因引入正常类器官,可实现肝脏肿瘤类器官的构建^[78]。这些疾病模型的建立为肝疾病机理研究,个性化治疗和药物开发提供了有潜力和价值的平台。

3.5 多器官芯片

人体内肝脏与其他组织器官具有紧密的关联和动态交互作用。多器官芯片技术的发展为体外模拟多个器官间互作和功能关联提供了新的策略。多器官芯片可通过循环流体将不同的器官功能模块连接起来,模拟人体器官生理微环境和功能耦联,从而更加准确地模拟体内器官间生理和病理互作,这有助于在器官水平深入理解人体系统疾病的发生和药物开发。Yang等^[79]建立了一种集成的肠-肝多器官芯片系统,用于模拟人肠-肝轴。该

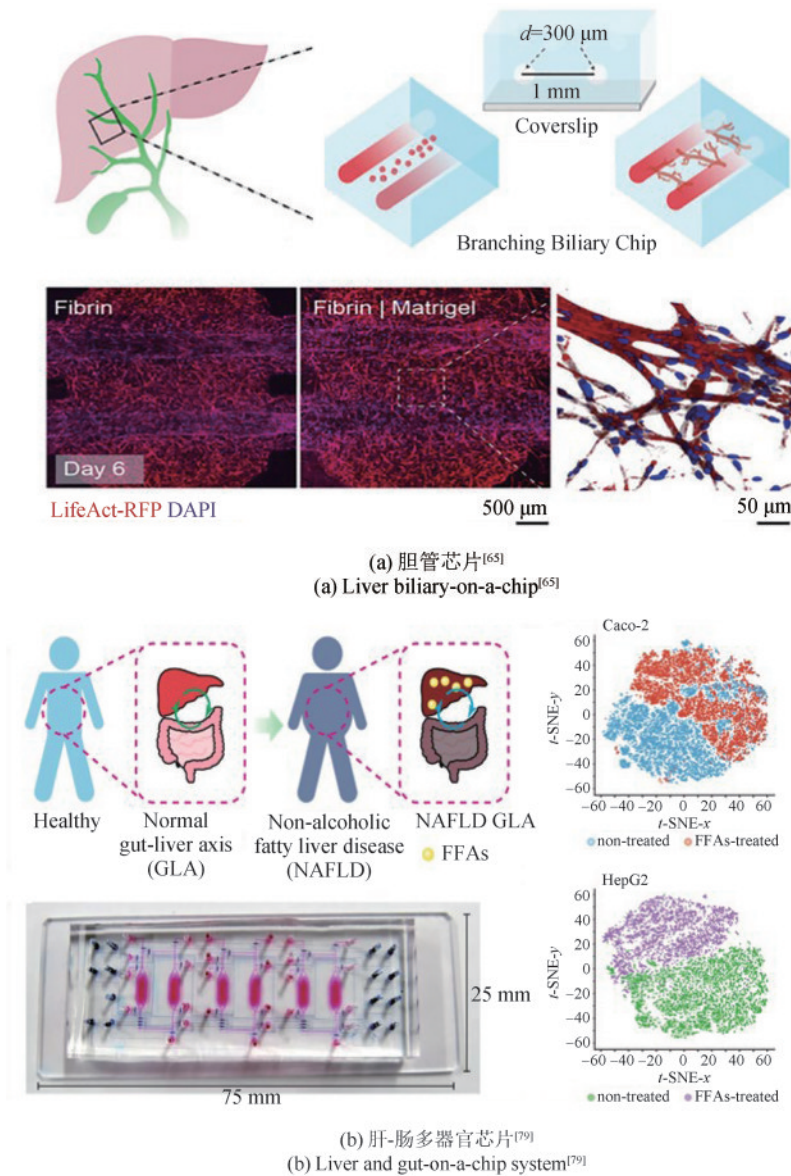


图2 不同类型的肝芯片

Fig. 2 Various types of liver-on-a-chip models

系统通过封闭循环回路中的微流体将肠细胞与肝细胞相互关联，并通过游离脂肪酸（FFA）暴露构建了NAFLD模型，以研究NAFLD的潜在机制[图2(b)]。该模型为研究脂肪肝等复杂代谢性疾病及新药研发提供了新的策略和技术。未来，多器官芯片有望用于研究系统性疾病在全身范围内的级联效应。

多器官芯片可用于评估肝脏与其他器官系统对外源暴露的反应。Maschmeyer等^[80]开发了一个四器官（肠、肝、皮肤和肾）芯片系统，以研究药物给药从吸收到排泄的影响，所有器官单元不

仅在28天内保持了活力，而且表现出与体内相当的功能基因和蛋白质表达特征。除了I、II、III期代谢活性的证据外，该多器官芯片中的肝脏表达对胆汁形成和分泌至关重要。Bovard等^[81]建立了肺-肝芯片模型，用于评估吸入毒性及其对肝脏的影响。他们将正常人支气管内皮细胞与HepaRG球状体共培养，观察真菌毒素对多器官的影响，证实了肝脏芯片技术可用于研究体内多个器官之间相互作用。本文作者团队^[82]前期曾构建了一种hiPSC来源的心肌-肝类器官体系用于抗抑郁药氯米帕明的药物毒性研究。结果显示，该药物在体

内具有肝代谢依赖性的心脏毒副作用。在另一些研究中,发现有些药物反应的出现依赖于组织间的相互作用,这提示在研究药物的疗效和副作用时,只针对一种器官进行药物评估可能会出现较大偏差,因而应同时考虑多种器官间的相互作用^[83-84]。此外,利用同一病人来源的干细胞,可实现干细胞衍生的不同组织器官模型构建,与多器官芯片系统相结合,再现人体器官的病理生理过程,有望实现人体的个性化精准医疗、毒理评价和新药开发。

4 肝芯片在疾病模拟和药物评价中的研究

传统2D细胞培养和动物模型难以准确地反映人体肝脏的功能和病理生理特征。基于肝芯片的疾病建模对于深入理解肝脏病理生理学、疾病机制、预防治疗和药物毒性评价等都具有重要意义。

4.1 疾病模拟

4.1.1 非酒精性/酒精性脂肪肝病

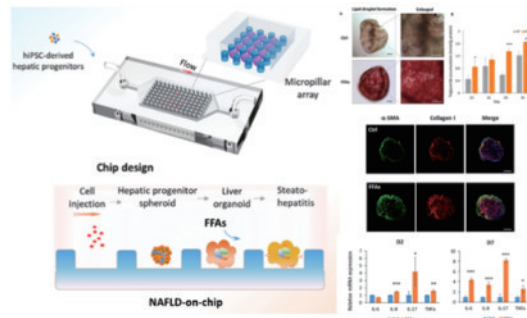
肝芯片可模拟肝代谢性疾病,如酒精性脂肪肝(ALD)和NAFLD等^[85-86]。NAFLD和ALD由甘油三酯沉积增加和随之而来的细胞异常引起,其共同的终点是脂肪性肝炎。随着疾病的进展,肝内受损区域周围纤维化间隔的积累可发展为肝硬化、肝细胞癌、肝功能衰竭和死亡。由于NAFLD和ALD都具有多因素病因,机制尚不完全清楚,因此迫切需要有效的病理模型。Lee等^[87]构建了酒精肝芯片模型,在灌流条件下共培养原代肝细胞和星状细胞,模拟酒精导致的肝组织结构变化和功能障碍,并监测星状细胞对损伤肝组织的修复过程。该平台在体外重现ALD方面显示出良好的结果,在模拟病理生理机制和测试新开发的治疗ALD药物方面具有巨大的潜力。Kostrzewski等^[88]建立了原代组织来源的3D肝芯片,在FFA暴露下模拟NAFLD的发展过程,显示脂肪过度积累后,肝细胞的代谢功能受损且CYP3A4和CYP2C9酶活性降低。本文作者团队利用肝类器官芯片体系模拟了NAFLD的发生发展过程。在FFA暴露下,肝

类器官表现出NAFLD相关的一系列病理特征^[89],包括脂滴形成、甘油三酯积累和肝纤维化等[图3(a)]。Shuler团队^[90]开发了一种由人肝细胞和脂肪细胞组成的人肝-脂肪芯片模型,该系统能够模拟影响肝疾病发生发展的代谢因素,并用于评估二甲双胍的治疗效果。该模型提供了一个有效的平台,不仅可以评估单一因素对NAFLD进展的影响和作用机制,还可用于临床前药物疗效的评价以及给药方案的优化。这些芯片上的肝病模型有望提供可靠的工具,用于研究脂肪肝病的病理过程和发病机制。

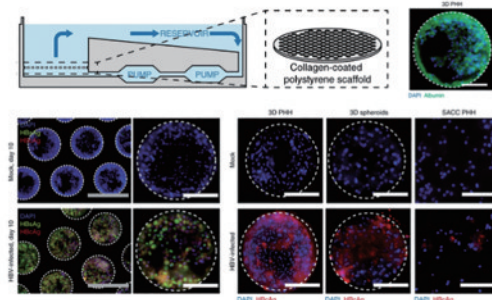
4.1.2 病毒性肝炎

乙肝病毒(HBV)和丙肝病毒(HCV)是通过血液传播的病毒性病原体,是肝硬化和肝癌的主要病因之一。虽然有针对HBV的有效疫苗,但目前的抗病毒疗法对减轻慢性感染并不完全有效。近年来,已开发强效抗病毒药物治疗HCV,但既往感染病例仍存在很大残留风险发展为肝细胞癌。肝炎感染的主要病理是由于适应性免疫系统的强烈激活,导致急性和慢性坏死性炎症性肝病。HBV和HCV病毒具有在宿主细胞肝细胞内感染和复制的能力,而不会引起显著的细胞溶解,这使得它们在免疫系统逃逸中非常有效。虽然这些病毒都是通过受体介导的内吞作用进入肝细胞,但它们使用的受体、进入肝细胞后的过程以及整体基因组结构和稳定性都有很大的不同,仍然难以捉摸。血清中乙肝表面抗原(HBsAg)的检测是急性HBV感染的标准诊断检测^[91]。

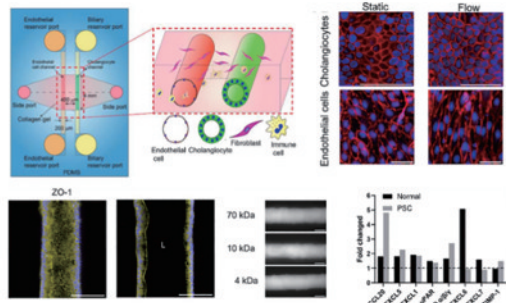
肝芯片可用于病毒感染研究,模拟病毒生长周期^[92-93]。Sodunke等^[94]在芯片单通道中培养原代大鼠肝细胞或HepG2,模拟HBV感染,显示携带HBV基因组的腺病毒感染了大多数大鼠肝细胞,导致HBV DNA释放到培养基中。类似地,Kang等^[95]将原代人肝细胞和牛主动脉内皮细胞在多孔膜两侧共培养,建立了肝窦芯片,用于HBV的长期感染研究。通过检测培养基中HBV DNA含量检测HBV感染肝细胞的疾病进展,乙肝核心抗原(HBcAg)的测试阳性也揭示着HBV在肝细胞中的复制。Ortega-Prieto等^[93]利用含微孔阵列的可灌注芯片,将原代肝细胞与Kupffer细胞共培养长达40天以上,以进行HBV的长期感染研究[图3(b)]。



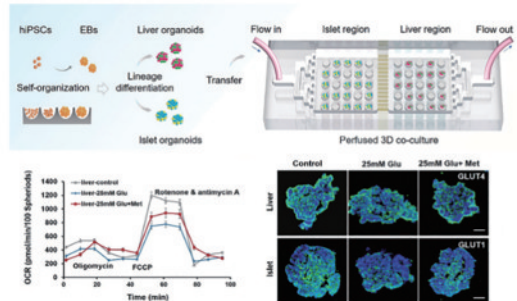
(a) 人干细胞衍生的肝类器官芯片模拟非酒精性脂肪肝病^[89]
 (a) Liver organoids-on-a-chip system for modeling human nonalcoholic fatty liver disease^[89]



(b) 3D 原代肝细胞芯片模拟乙型肝炎病毒感染^[93]
 (b) 3D microfluidic primary human hepatocyte chip system for studying hepatitis B virus infection^[93]



(c) 人血管化胆管芯片用于研究胆汁淤积性肝病^[96]
 (c) Human vascularized bile duct-on-a chip for studying cholestatic liver disease^[96]



(d) 人干细胞衍生的肝-胰岛类器官芯片模拟 II 型糖尿病及药物测试^[97]
 (d) Liver and islet organoid-on-a-chip system from hiPSCs for modeling type 2 diabetes and drug testing^[97]

图3 肝芯片在疾病模拟和药物评价中的应用

Fig. 3 Various types of liver -on-a-chip models

研究发现3D肝组织易受HBV感染,导致HBsAg和HBV DNA的释放,并观察到与体内相似的先天免疫和细胞因子反应。该模型适用于研究肝细胞和非实质细胞的相互作用对病毒感染免疫反应的影响,为研究宿主-病原体相互作用及病毒致病机理提供了一个有价值的平台。

4.1.3 胆管疾病

原发性胆汁性肝硬化(PBC)和原发性硬化性胆管炎(PSC)等慢性胆汁淤积性肝病是成人中两种主要的胆管疾病,通常与胆管上皮细胞/胆管细胞紧密连接的改变有关,其发病机制和治疗方法仍然具有挑战性,部分原因是缺乏能够模拟导致疾病进展的复杂微环境的体外模型。PSC与PBC相比在组织学上有所不同。PBC被定义为胆道上皮细胞的慢性损伤,有证据表明白细胞介素-12和干扰素 γ 对诱导的免疫介导的淋巴细胞性胆管炎具有重要作用。组织学上,该疾病以进行性肉芽肿破坏渗透到小肝内管,许多胆管细胞表现出凋亡或衰老。相反,在PSC中,炎症、纤维化和胆汁淤积之间似乎存在实质性的相互作用,可能源于肠道微生物的初始微生物反应或来自门静脉的细菌产物,导致胆道周围的纤维闭塞性病变。因此,PBC和PSC的免疫系统有助于其胆汁淤积自我维持的性质,使这些疾病的体外建模具有挑战性。PSC和PBC等疾病的遗传易感性研究可使用胆小管或分支网络芯片模型,重点关注胆管发育、连接和纤毛信号通路的变化。Du等^[96]建立了一种血管化胆管芯片,使用正常胆管组织来源的胆管类器官和血管内皮细胞模拟3D功能性胆管和血管结构[图3(c)]。胆管中的胆管细胞发生极化并形成成熟的紧密连接。通过灌注细胞排列的通道来模拟血液和胆汁的流动,该系统中胆管细胞和内皮细胞分别对流体表现出不同的反应。进一步利用病人PSC来源的胆管组织建立胆管类器官,在病人特异性胆管类器官构建的血管化胆管芯片上揭示了IL-17A的刺激增强了胆管细胞的炎症反应并诱导外周血单核细胞和分化的Th17细胞跨血管通道迁移。该血管化胆管芯片在结构和功能上重现了血管-胆管组织界面,为研究炎症和纤维化胆汁淤积性肝病提供了新的平台。

4.1.4 其他疾病

II型糖尿病(T2DM)是一种系统性的多器官代谢性疾病,其特征是不同器官之间的动态相互作用。T2DM的特征是高血糖和胰岛素抵抗,通常伴有胰岛 β 细胞功能障碍和肝脏胰岛素抵抗的组合。肝和胰岛是维持体内血糖稳态调控的两个关键器官,明确肝和胰岛间的相互通信将为新药靶点开发、再生医学等提供线索。然而由于肝和胰岛之间的通信受激素和营养物质等全身因素调控,解析清胰岛和肝在血糖稳态、糖代谢紊乱中的相互作用仍然具有挑战性。多器官芯片通过可控的细胞腔室连接为区分体内器官系统的直接和间接影响提供了新方法。Qin团队^[97]建立了一种新型肝-胰岛类器官互作芯片体系,实现了hiPSC来源的肝和胰岛类器官的动态培养和相互作用研究,模拟了II型糖尿病的主要病理特征和降糖药二甲双胍的治疗反应,在体外再现了人肝-胰岛轴在生理和病理情况下的糖调控特点[图3(d)]。该模型为糖尿病等复杂代谢性疾病研究和新药发现等提供了新策略和新技术。

4.2 药物评价

4.2.1 药理学评估

肝器官芯片作为一种近生理的体外3D模型,在药物评价方面显示出重要应用潜力^[98-99]。药理学评估通常与疾病建模密切相关,准确模拟肝脏疾病的病理特征是实现肝芯片精准药物评价的关键。Hendriks等^[100]利用肝芯片建立了NAFLD疾病模型,模拟了NAFLD的多种触发因素,包括脂肪酸负荷、个体间遗传变异及单基因脂质疾病,为深入解析疾病机制和个性化治疗提供了新的思路。该芯片评估了不同药物对NAFLD的预防或治疗效果。结果显示,吡格列酮通过改变脂质代谢和诱导脂蛋白脂酶的表达来减少甘油三酯的积累,而二甲双胍可以通过减少细胞对培养基中FFA的消耗,降低肝细胞中的脂肪蓄积。此外,Liu等^[64]利用3D打印技术构建了胆管癌芯片模型,该模型由细胞外基质、胆管癌细胞、肝细胞和血管内皮细胞组成,模拟了肝实质-血管-胆道的组织结构与微环境,并用于环磷酰胺(CTX)的药效评估。

结果显示, CTX对二维胆管癌细胞无显著毒性, 但对3D胆管癌芯片表现为剂量依赖的毒性, 说明胆管癌3D组织结构和仿生微环境在药物评估中的优势。

体内药物的吸收、运输、代谢和排出涉及多种器官间的相互协作, 这些过程涉及到药物的药代动力学(pharmacokinetics, PK)和药效学(pharmacodynamics, PD)。虽然PK和PD的准确预测对药物开发至关重要, 但传统体外模型难以真实地模拟这种复杂的生理过程。多器官芯片系统可模拟组织和器官间复杂的功能耦联特征^[101-102], 对于体外研究药物的疗效和代谢特征具有重要意义。Shuler团队^[103]开发了一个无泵设计的肝-肿瘤-骨髓多器官芯片系统, 模拟了不同器官间相互作用及抗癌药物5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)的PK-PD特征。研究发现不同类型的细胞对5-FU的响应不同, 且动态培养环境下细胞的反应与静态培养有显著差异。该系统提高了药物代谢过程和毒性预测的准确性, 并有助于深入了解药物的作用机制。此外, 将复杂计算模型引入多器官芯片体系, 以提升PK/PD预测的准确性, 已成为器官芯片的发展趋势。Herland等^[104]通过流体耦合的人肠、肝和肾的双通道器官芯片, 建立了药物在体内吸收、代谢和排泄的首过效应模型。Ronaldson-Bouchard等^[105]则通过流体耦合的心脏、肝、骨骼和皮肤多器官芯片, 构建了多隔室的体外-体内转化(*in vitro-in vivo translation*, IVIVT)计算模型, 用于预测阿霉素在人体中的PK/PD特征。尽管目前与复杂计算模型结合的多器官芯片已经显示出一定的体内PK/PD预测能力, 但由于不同芯片、不同药物以及IVIVT模型参数的差异, 还需要大量的数据积累来验证其预测能力的可行性。

4.2.2 毒性评价

药物引起的肝毒性和药物性肝损伤(DILI)是诱发肝脏疾病的主要因素之一, 现阶段药物毒理学研究主要依赖于2D细胞培养体系和动物模型。由于传统模型存在一定局限性, 许多药物上市后因未预测到的肝毒性而退市。肝芯片具有仿生3D组织结构和多细胞相互作用, 能准确地模拟药物或化合物在体内的传递和转运, 评价药物可

能产生的不良反应和毒性效应, 有望减少动物试验和临床试验中的不必要风险^[106-108]。Vernetti等^[109]建立了人肝微生理平台SQL-SAL用于疾病模拟和药物毒性评价, 该系统使用原代人肝细胞以及生理比例的人血管内皮细胞(EA.hy926)、免疫细胞(U937)和肝星状细胞(LX-2), 在动态培养条件下可维持28天以上的细胞活性, 表现出稳定的药物代谢活性、蛋白质分泌等功能, 对多种药物/化合物具有肝毒性响应。作者将从体外模型收集的数据整合到数据库, 以支持外部访问, 与测试药物相关化学、生物活性、临床前和临床信息相整合, 用于构建预测模型。此外, Bircsak等^[110]开发了一种肝芯片OrganoPlate LiverTox™用于高通量、自动化药物肝毒性筛选。该芯片由iPSC衍生的肝细胞聚集体、内皮细胞和分化为巨噬细胞的THP-1单核细胞共培养, 显示出良好的肝组织功能。进一步将包含159种已知对肝脏有影响的化合物文库加入到该模型中, 在50 μmol/L下放置72 h, 计算毒理学优先级评分。物种差异性通常被认为是造成动物模型毒性预测局限性的最重要的原因之一, 肝芯片可以很好地补充这一缺陷。Jang等^[111]建立了不同物种(大鼠、犬或人)来源的肝芯片模型, 在动态培养条件下由肝细胞和非实质细胞(内皮细胞、Kupffer细胞和星状细胞)共培养, 模拟不同物种的肝脏微环境。通过评估药物引起的不同的肝损伤表型, 如胆汁淤积、脂肪变性和纤维化, 鉴定出不同物种对药物代谢和诱导肝毒性的不同响应, 揭示了人体与动物实验中肝毒性的相关性, 从而更好地确定用药安全性。为了验证肝芯片在药物毒性测试方面的应用潜力, Ewart等^[112]利用870个由人原代组织来源的肝器官芯片模型, 对27种已知肝毒性药物进行了评估, 验证它们对药物性肝损伤的评价效果。结果显示, 肝芯片对药物毒性测试的灵敏度为87%, 特异性为100%。该工作在一定程度上体现了这种新型肝芯片模型用于药物毒性评估的可靠性和经济学价值。

肝类器官因具有器官特异的多细胞组分, 为肝芯片构建提供了重要的细胞来源, 有望提高肝毒性评价的灵敏度^[113]。Zhang等^[114]建立了基于人肝类器官芯片的高通量DILI风险预测平台, 芯片

上的肝类器官具有增强的白蛋白分泌和CYP 450表达,并对肝毒性药物产生反应。通过表型和转录组分析,肝类器官芯片可预测替诺福韦-伊那瑞吉韦的协同肝毒性,与DILI临床表现相关,在暴露于氟尿苷和对乙酰氨基酚时分别显示脂肪变性和线粒体功能障碍,证明了其在DILI风险评估中的应用潜力。这些研究证明了肝芯片用于研究物种特异性药物反应的潜力,在探索与人体相关的DILI机制和肝毒性预测能力方面具有重要意义。

5 结 语

综上所述,肝器官芯片通过模拟肝组织的复杂细胞组成、因子梯度、机械流体等生物化学和生物物理微环境因素,可在组织水平上再现肝脏的关键结构和功能特征,在生物学研究、疾病模拟和药物评价等方面展示出广泛的应用前景。特别是,肝器官芯片工程策略有利于实现肝组织血管化形成、器官间互作以及组织微环境的控制,显著弥补了传统肝模型研究中的一些局限。然而,如何构建更高保真度的肝芯片模型,用以准确复现肝组织的特异性功能以及提高非临床药物测试的准确性等,还有很大的提升空间。例如,目前常用肝芯片的制备材料主要为PDMS,易吸收或释放疏水性分子,特别是小分子药物和激素等,这可能对药物转运和毒性预测等定量研究造成一定影响,限制其在药物筛选方面的应用。开发更符合应用需求的生物材料,如惰性且具有生物相容性的合成聚合物取代PDMS可以有效解决这些问题。在细胞方面,单纯肝类器官通常缺乏关键的细胞类型,如血管内皮细胞等。此外,类器官缺乏可控的细胞微环境和功能成熟度,导致其不能长期培养和功能维持,在一定程度上也限制了其转化应用,器官芯片可以通过整合血管网络结构或结合支架材料来克服这些挑战。

未来,将器官芯片与其他先进的前沿交叉技术(包括类器官、生物材料和合成生物学工具等)结合,有利于构建具有高度生理相关性的肝芯片模型系统,加深对肝脏生理和病理的理解,促进肝器官芯片在临床前药物测评、毒性预测等方面的转化应用。将器官芯片与干细胞衍生类器官结

合,通过创建可控的细胞微环境,可以充分挖掘类器官的潜力,形成具有复杂细胞类型和近生理的体外肝模型。将器官芯片与合成生物学工具相结合,有助于优化芯片设计策略,扩展肝器官芯片的功能,促进生物元件的创新与进步。例如,将肝器官芯片与干细胞和基因编辑技术结合,可建立具有特定人群特征的遗传病和罕见病等疾病模型,深入探讨肝脏疾病的复杂机制,从而推动个性化医疗和新药开发的进程。将肝器官芯片与多组学和人工智能分析手段结合,能够丰富肝芯片模型的生物学信息来源,增强数据挖掘的能力。这种数据驱动的技术将为合成生物学研究和复杂生物学过程解析提供新的思路。此外,结合高灵敏传感检测技术,将进一步提升肝芯片模型的检测分析性能,增强模型系统的整合检测和预测能力。最后,以器官芯片为代表的新型实验工具和替代方法的发展需要标准化体系^[115-116]和科学监管来共同推动技术进步和创新,从而更有效地形成高质量产品,加速转化应用。要实现这些目标,需要依靠多学科交叉领域专家、学者和研发人员的协作与共同努力。

参 考 文 献

- [1] HUH D, MATTHEWS B D, MAMMOTO A, et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip[J]. *Science*, 2010, 328(5986): 1662-1668.
- [2] BHATIA S N, INGBER D E. Microfluidic organs-on-chips[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(8): 760-772.
- [3] MAHLER G J, ESCH M B, GLAHN R P, et al. Characterization of a gastrointestinal tract microscale cell culture analog used to predict drug toxicity[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 104(1): 193-205.
- [4] WANG L, TAO T T, SU W T, et al. A disease model of diabetic nephropathy in a *Glomerulus*-on-a-chip microdevice[J]. *Lab on a Chip*, 2017, 17(10): 1749-1760.
- [5] 秦建华, 张敏, 于浩, 等. 人体器官芯片[J]. *中国科学院院刊*, 2017, 32(12): 1281-1289.
QIN J H, ZHANG M, YU H, et al. Human organs-on-a-chip[J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2017, 32(12): 1281-1289.
- [6] LI Z Y, SU W T, ZHU Y J, et al. Drug absorption related nephrotoxicity assessment on an intestine-kidney chip[J].

- Biomicrofluidics, 2017, 11(3): 034114.
- [7] MORADI E, JALILI-FIROOZINEZHAD S, SOLATI-HASHJIN M. Microfluidic organ-on-a-chip models of human liver tissue[J]. Acta Biomaterialia, 2020, 116: 67-83.
- [8] YOON NO D, 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[J]. Lab on a Chip, 2015, 15(19): 3822-3837.
- [9] BECKWITT C H, CLARK A M, WHEELER S, et al. Liver 'organ on a chip' [J]. Experimental Cell Research, 2018, 363(1): 15-25.
- [10] MATERNE E M, TONEVITSKY A G, MARX U. Chip-based liver equivalents for toxicity testing: organotypicalness versus cost-efficient high throughput[J]. Lab on a Chip, 2013, 13(18): 3481-3495.
- [11] SØRENSEN K K, SIMON-SANTAMARIA J, MCCUSKEY R S, et al. Liver sinusoidal endothelial cells[J]. Comprehensive Physiology, 2015, 5(4): 1751-1774.
- [12] SENOO H. Structure and function of hepatic stellate cells[J]. Medical Electron Microscopy, 2004, 37(1): 3-15.
- [13] DIXON L J, BARNES M, TANG H, et al. Kupffer cells in the liver[J]. Comprehensive Physiology, 2013, 3(2): 785-797.
- [14] EHRLICH A, DUCHE D, OUEDRAOGO G, et al. Challenges and opportunities in the design of liver-on-chip microdevices [J]. Annual Review of Biomedical Engineering, 2019, 21: 219-239.
- [15] BAUDY A R, OTIENO M A, HEWITT P, et al. Liver microphysiological systems development guidelines for safety risk assessment in the pharmaceutical industry[J]. Lab on a Chip, 2020, 20(2): 215-225.
- [16] HUGHES D J, KOSTRZEWSKI T, SCEATS E L. Opportunities and challenges in the wider adoption of liver and interconnected microphysiological systems[J]. Experimental Biology and Medicine, 2017, 242(16): 1593-1604.
- [17] BHUSHAN A, SENUTOVITCH N, BALE S S, et al. Towards a three-dimensional microfluidic liver platform for predicting drug efficacy and toxicity in humans[J]. Stem Cell Research & Therapy, 2013, 4(Suppl 1): S16.
- [18] ZHANG J W, ZHAO X, LIANG L G, et al. A decade of progress in liver regenerative medicine[J]. Biomaterials, 2018, 157: 161-176.
- [19] HEYDARI Z, NAJIMI M, MIRZAEI H, et al. Tissue engineering in liver regenerative medicine: insights into novel translational technologies[J]. Cells, 2020, 9(2): 304.
- [20] GEBHARDT R, MATZ-SOJA M. Liver zonation: novel aspects of its regulation and its impact on homeostasis[J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(26): 8491-8504.
- [21] HEWITT N J, LECHÓN M J, HOUSTON J B, et al. Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies[J]. Drug Metabolism Reviews, 2007, 39(1): 159-234.
- [22] LECLUYSE E L. Human hepatocyte culture systems for the *in vitro* evaluation of cytochrome P450 expression and regulation [J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001, 13(4): 343-368.
- [23] LÜBBERSTEDT M, MÜLLER-VIEIRA U, MAYER M, et al. HepaRG human hepatic cell line utility as a surrogate for primary human hepatocytes in drug metabolism assessment *in vitro*[J]. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2011, 63(1): 59-68.
- [24] WILKENING S, STAHL F, BADER A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties[J]. Drug Metabolism and Disposition, 2003, 31(8): 1035-1042.
- [25] GUGUEN-GUILLOUZO C, GUILLOUZO A. General review on *in vitro* hepatocyte models and their applications[J]. Methods in Molecular Biology, 2010, 640: 1-40.
- [26] LECLUYSE E L, WITEK R P, ANDERSEN M E, et al. Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing[J]. Critical Reviews in Toxicology, 2012, 42(6): 501-548.
- [27] INOUE H, NAGATA N, KUROKAWA H, et al. iPS cells: a game changer for future medicine[J]. EMBO Journal, 2014, 33(5): 409-417.
- [28] ROBINSON D A, DALEY G Q. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy[J]. Nature, 2012, 481(7381): 295-305.
- [29] SAMPAZIOTIS F, SEGERITZ C P, VALLIER L. Potential of human induced pluripotent stem cells in studies of liver disease [J]. Hepatology, 2015, 62(1): 303-311.
- [30] SCOTT C W, PETERS M F, DRAGAN Y P. Human induced pluripotent stem cells and their use in drug discovery for toxicity testing[J]. Toxicology Letters, 2013, 219(1): 49-58.
- [31] SCHWARTZ R E, FLEMING H E, KHETANI S R, et al. Pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells[J]. Biotechnology Advances, 2014, 32(2): 504-513.
- [32] SI-TAYEB K, NOTO F K, NAGAOKA M, et al. Highly

- efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells[J]. *Hepatology*, 2010, 51(1): 297-305.
- [33] SONG Z H, CAI J, LIU Y X, et al. Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells[J]. *Cell Research*, 2009, 19(11): 1233-1242.
- [34] TAKATA A, OTSUKA M, KOGISO T, et al. Direct differentiation of hepatic cells from human induced pluripotent stem cells using a limited number of cytokines[J]. *Hepatology International*, 2011, 5(4): 890-898.
- [35] BANAEIYAN A A, THEOBALD J, PAUKŠTYTE J, et al. Design and fabrication of a scalable liver-lobule-on-a-chip microphysiological platform[J]. *Biofabrication*, 2017, 9(1): 015014.
- [36] CLEVERS H. Modeling development and disease with organoids[J]. *Cell*, 2016, 165(7): 1586-1597.
- [37] FATEHULLAH A, TAN S H, BARKER N. Organoids as an *in vitro* model of human development and disease[J]. *Nature Cell Biology*, 2016, 18(3): 246-254.
- [38] GUAN Y, XU D, GARFIN P M, et al. Human hepatic organoids for the analysis of human genetic diseases[J]. *JCI Insight*, 2017;2(17):e94954.
- [39] SGODDA M, DAI Z, ZWEIGERDT R, et al. A scalable approach for the generation of human pluripotent stem cell-derived hepatic organoids with sensitive hepatotoxicity features [J]. *Stem Cells and Development*, 2017, 26(20): 1490-1504.
- [40] HUCH M, GEHART H, VAN BOXTEL R, et al. Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver[J]. *Cell*, 2015, 160(1-2): 299-312.
- [41] SUDO R, MITAKA T, IKEDA M, et al. Reconstruction of 3D stacked-up structures by rat small hepatocytes on microporous membranes[J]. *FASEB Journal*, 2005, 19(12): 1695-1697.
- [42] SCOTT M J, LIU S B, SU G L, et al. Hepatocytes enhance effects of lipopolysaccharide on liver nonparenchymal cells through close cell interactions[J]. *Shock*, 2005, 23(5): 453-458.
- [43] OSTROVIDOV S, JIANG J L, SAKAI Y, et al. Membrane-based PDMS microreactor for perfused 3D primary rat hepatocyte cultures[J]. *Biomedical Microdevices*, 2004, 6(4): 279-287.
- [44] FOSTER E, YOU J, SILTANEN C, et al. Heparin hydrogel sandwich cultures of primary hepatocytes[J]. *European Polymer Journal*, 2015, 72: 726-735.
- [45] THOMAS R J, BHANDARI R, BARRETT D A, et al. The effect of three-dimensional co-culture of hepatocytes and hepatic stellate cells on key hepatocyte functions *in vitro*[J]. *Cells, Tissues, Organs*, 2005, 181(2): 67-79.
- [46] ZINCHENKO Y S, SCHRUM L W, CLEMENS M, et al. Hepatocyte and Kupffer cells co-cultured on micropatterned surfaces to optimize hepatocyte function[J]. *Tissue Engineering*, 2006, 12(4): 751-761.
- [47] FREVERT U, ENGELMANN S, ZOUGBÉDÉ S, et al. Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver[J]. *PLoS Biology*, 2005, 3(6): e192.
- [48] SHIH M C, TSENG S H, WENG Y S, et al. A microfluidic device mimicking acinar concentration gradients across the liver acinus[J]. *Biomedical Microdevices*, 2013, 15(5): 767-780.
- [49] HEGDE M, JINDAL R, BHUSHAN A, et al. Dynamic interplay of flow and collagen stabilizes primary hepatocytes culture in a microfluidic platform[J]. *Lab on a Chip*, 2014, 14(12): 2033-2039.
- [50] ASAI A, AIHARA E, WATSON C, et al. Paracrine signals regulate human liver organoid maturation from induced pluripotent stem cells[J]. *Development*, 2017, 144(6): 1056-1064.
- [51] TAKEBE T, SEKINE K, ENOMURA M, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant[J]. *Nature*, 2013, 499(7459): 481-484.
- [52] ZHANG B Y, MONTGOMERY M, CHAMBERLAIN M D, et al. Biodegradable scaffold with built-in vasculature for organ-on-a-chip engineering and direct surgical anastomosis[J]. *Nature Materials*, 2016, 15(6): 669-678.
- [53] FRITSCHEN A, LINDNER N, SCHOLPP S, et al. High-scale 3D-bioprinting platform for the automated production of vascularized organs-on-a-chip[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2024, 13(17): e2304028.
- [54] HO C T, LIN R Z, CHEN R J, et al. Liver-cell patterning lab chip: mimicking the morphology of liver lobule tissue[J]. *Lab on a Chip*, 2013, 13(18): 3578-3587.
- [55] POISSON J, LEMOINNE S, BOULANGER C, et al. Liver sinusoidal endothelial cells: physiology and role in liver diseases[J]. *Journal of Hepatology*, 2017, 66(1): 212-227.
- [56] HOEHME S, BRULPORT M, BAUER A, et al. Prediction and validation of cell alignment along microvessels as order principle to restore tissue architecture in liver regeneration[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(23): 10371-10376.
- [57] DU K, LI S B, LI C P, et al. Modeling nonalcoholic fatty liver disease on a liver lobule chip with dual blood supply[J]. *Acta Biomaterialia*, 2021, 134: 228-239.

- [58] LEE P J, HUNG P J, LEE L P. An artificial liver sinusoid with a microfluidic endothelial-like barrier for primary hepatocyte culture[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 97(5): 1340-1346.
- [59] PRODANOV L, JINDAL R, BALE S S, et al. Long-term maintenance of a microfluidic 3D human liver sinusoid[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(1): 241-246.
- [60] RENNERT K, STEINBORN S, GRÖGER M, et al. A microfluidically perfused three dimensional human liver model [J]. *Biomaterials*, 2015, 71: 119-131.
- [61] NAKAO Y, KIMURA H, SAKAI Y, et al. Bile canaliculi formation by aligning rat primary hepatocytes in a microfluidic device[J]. *Biomicrofluidics*, 2011, 5(2): 22212.
- [62] MATSUMOTO K, IMASATO M, YAMAZAKI Y, et al. Claudin 2 deficiency reduces bile flow and increases susceptibility to cholesterol gallstone disease in mice[J]. *Gastroenterology*, 2014, 147(5): 1134-1145.e10.
- [63] DU Y, KHANDEKAR G, LLEWELLYN J, et al. A bile duct-on-a-chip with organ-level functions[J]. *Hepatology*, 2020, 71(4): 1350-1363.
- [64] LIU Q, MILLE L S, VILLALOBOS C, et al. 3D-bioprinted cholangiocarcinoma-on-a-chip model for evaluating drug responses[J]. *Bio-Design and Manufacturing*, 2023, 6(4): 373-389.
- [65] SMITH Q, BAYS J, LI L Q, et al. Directing cholangiocyte morphogenesis in natural biomaterial scaffolds[J]. *Advanced Science*, 2022, 9(3): e2102698.
- [66] HUCH M, DORRELL C, BOJ S F, et al. *In vitro* expansion of single Lgr5⁺ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration[J]. *Nature*, 2013, 494(7436): 247-250.
- [67] NANTASANTI S, SPEE B, KRUITWAGEN H S, et al. Disease modeling and gene therapy of copper storage disease in canine hepatic organoids[J]. *Stem Cell Reports*, 2015, 5(5): 895-907.
- [68] KRUITWAGEN H S, OOSTERHOFF L A, VERNOOIJ I G W H, et al. Long-term adult feline liver organoid cultures for disease modeling of Hepatic steatosis[J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 8(4): 822-830.
- [69] KAFTANOVSKAYA E M, NG H H, SOULA M, et al. Therapeutic effects of a small molecule agonist of the relaxin receptor ML290 in liver fibrosis[J]. *FASEB Journal*, 2019, 33(11): 12435-12446.
- [70] GÓMEZ-MARIANO G, MATAMALA N, MARTÍNEZ S, et al. Liver organoids reproduce alpha-1 antitrypsin deficiency-related liver disease[J]. *Hepatology International*, 2020, 14(1): 127-137.
- [71] NIE Y Z, ZHENG Y W, MIYAKAWA K, et al. Recapitulation of hepatitis B virus-host interactions in liver organoids from human induced pluripotent stem cells[J]. *EBioMedicine*, 2018, 35: 114-123.
- [72] GURAL N, MANCIO-SILVA L, HE J, et al. Engineered livers for infectious diseases[J]. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2018, 5(2): 131-144.
- [73] PARK S E, GEORGESC A, HUH D E. Organoids-on-a-chip [J]. *Science*, 2019, 364(6444): 960-965.
- [74] WANG Y Q, WANG L, ZHU Y J, et al. Human brain organoid-on-a-chip to model prenatal nicotine exposure[J]. *Lab on a Chip*, 2018, 18(6): 851-860.
- [75] ZHU Y J, WANG L, YU H, et al. *In situ* generation of human brain organoids on a micropillar array[J]. *Lab on a Chip*, 2017, 17(17): 2941-2950.
- [76] TAKEBE T, ZHANG B Y, RADISIC M. Synergistic engineering: organoids meet organs-on-a-chip[J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 21(3): 297-300.
- [77] WANG Y Q, WANG H, DENG P W, et al. *In situ* differentiation and generation of functional liver organoids from human iPSCs in a 3D perfusable chip system[J]. *Lab on a Chip*, 2018, 18(23): 3606-3616.
- [78] ARTEGANI B, VAN VOORTHUIJSEN L, LINDEBOOM R G H, et al. Probing the tumor suppressor function of BAP1 in CRISPR-engineered human liver organoids[J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(6): 927-943.e6.
- [79] YANG J D, HIRAI Y, IIDA K, et al. Integrated-gut-liver-on-a-chip platform as an *in vitro* human model of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Communications Biology*, 2023, 6(1): 310.
- [80] 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[J]. *Lab on a Chip*, 2015, 15(12): 2688-2699.
- [81] BOVARD D, SANDOZ A, LUETTICH K, et al. A lung/liver-on-a-chip platform for acute and chronic toxicity studies[J]. *Lab on a Chip*, 2018, 18(24): 3814-3829.
- [82] YIN F C, ZHANG X, WANG L, et al. HiPSC-derived multi-organoids-on-chip system for safety assessment of antidepressant drugs[J]. *Lab on a Chip*, 2021, 21(3): 571-581.
- [83] LUCCHETTI M, AINA K O, GRANDMOUGIN L, et al. An organ-on-chip platform for simulating drug metabolism along the gut-liver axis[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2024, 13(20): e2303943.

- [84] AIZENSHTADT A, WANG C C, ABADPOUR S, et al. Pump-less, recirculating organ-on-chip (rOoC) platform to model the metabolic crosstalk between islets and liver[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2024, 13(13): e2303785.
- [85] HASSAN S, SEBASTIAN S, MAHARJAN S, et al. Liver-on-a-chip models of fatty liver disease[J]. *Hepatology*, 2020, 71(2): 733-740.
- [86] LASLI S, KIM H J, LEE K J, et al. A human liver-on-a-chip platform for modeling nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Advanced Biosystems*, 2019, 3(8): e1900104.
- [87] LEE J S, CHOI B H, NO D Y, et al. A 3D alcoholic liver disease model on a chip[J]. *Integrative Biology*, 2016, 8(3): 302-308.
- [88] KOSTRZEWSKI T, CORNFORTH T, SNOW S A, et al. Three-dimensional perfused human *in vitro* model of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2017, 23(2): 204-215.
- [89] WANG Y Q, WANG H, DENG P W, et al. Modeling human nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) with an organoids-on-a-chip system[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2020, 6(10): 5734-5743.
- [90] SLAUGHTER V L, RUMSEY J W, BOONE R, et al. Validation of an adipose-liver human-on-a-chip model of NAFLD for preclinical therapeutic efficacy evaluation[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 13159.
- [91] LIN C L, KAO J H. Review article: novel therapies for hepatitis B virus cure-advances and perspectives[J]. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2016, 44(3): 213-222.
- [92] ORTEGA-PRIETO A M, CHERRY C, GUNN H, et al. *In vivo* model systems for hepatitis B virus research[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2019, 5(5): 688-702.
- [93] ORTEGA-PRIETO A M, SKELTON J K, WAI S N, et al. 3D microfluidic liver cultures as a physiological preclinical tool for hepatitis B virus infection[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 682.
- [94] SODUNKE T R, BOUCHARD M J, NOH H M. Microfluidic platform for hepatitis B viral replication study[J]. *Biomedical Microdevices*, 2008, 10(3): 393-402.
- [95] KANG Y, RAWAT S, DUCHEMIN N, et al. Human liver sinusoid on a chip for hepatitis B virus replication study[J]. *Micromachines*, 2017, 8(1): 27.
- [96] DU Y, DE JONG I E M, GUPTA K, et al. Human vascularized bile duct-on-a chip: a multi-cellular micro-physiological system for studying cholestatic liver disease[J]. *Biofabrication*, 2023, 16(1): 015004.
- [97] TAO T T, DENG P W, WANG Y Q, et al. Microengineered multi-organoid system from hiPSCs to recapitulate human liver-islet axis in normal and type 2 diabetes[J]. *Advanced Science*, 2022, 9(5): e2103495.
- [98] LI L, KNUTSDOTTIR H, HUI K, et al. Human primary liver cancer organoids reveal intratumor and interpatient drug response heterogeneity[J]. *JCI Insight*, 2019, 4(2): e121490.
- [99] BROUTIER L, MASTROGIOVANNI G, VERSTEGEN M M, et al. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening[J]. *Nature Medicine*, 2017, 23(12): 1424-1435.
- [100] HENDRIKS D, BROUWERS J F, HAMER K, et al. Engineered human hepatocyte organoids enable CRISPR-based target discovery and drug screening for steatosis[J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41(11): 1567-1581.
- [101] ZHU Y X, JIANG D M, QIU Y, et al. Dynamic microphysiological system chip platform for high-throughput, customizable, and multi-dimensional drug screening[J]. *Bioactive Materials*, 2024, 39: 59-73.
- [102] LI Z Y, JIANG L, ZHU Y J, et al. Assessment of hepatic metabolism-dependent nephrotoxicity on an organs-on-a-chip microdevice[J]. *Toxicology in Vitro*, 2018, 46: 1-8.
- [103] SUNG J H, KAM C, SHULER M L. A microfluidic device for a pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model on a chip [J]. *Lab on a Chip*, 2010, 10(4): 446-455.
- [104] HERLAND A, MAOZ B M, DAS D, et al. Quantitative prediction of human pharmacokinetic responses to drugs *via* fluidically coupled vascularized organ chips[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2020, 4(4): 421-436.
- [105] RONALDSON-BOUCHARD K, TELES D, YEAGER K, et al. A multi-organ chip with matured tissue niches linked by vascular flow[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2022, 6(4): 351-371.
- [106] MA C, ZHAO L, ZHOU E M, et al. On-chip construction of liver lobule-like microtissue and its application for adverse drug reaction assay[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(3): 1719-1727.
- [107] KOSTADINOVA R, BOESS F, APPELEGATE D, et al. A long-term three dimensional liver co-culture system for improved prediction of clinically relevant drug-induced hepatotoxicity [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2013, 268(1): 1-16.
- [108] LEE-MONTIEL F T, GEORGE S M, GOUGH A H, et al. Control of oxygen tension recapitulates zone-specific functions in human liver microphysiology systems[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2017, 242(16): 1617-1632.

- [109] VERNETTI L A, SENUTOVITCH N, BOLTZ R, et al. A human liver microphysiology platform for investigating physiology, drug safety, and disease models[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2016, 241(1): 101-114.
- [110] BIRCSAK K M, DEBIASIO R, MIEDEL M, et al. A 3D microfluidic liver model for high throughput compound toxicity screening in the OrganoPlate®[J]. *Toxicology*, 2021, 450: 152667.
- [111] JANG K J, OTIENO M A, RONXHI J, et al. Reproducing human and cross-species drug toxicities using a Liver-Chip[J]. *Science Translational Medicine*, 2019, 11(517): eaax5516.
- [112] EWART L, APOSTOLOU A, BRIGGS S A, et al. Performance assessment and economic analysis of a human Liver-Chip for predictive toxicology[J]. *Communications Medicine*, 2022, 2(1): 154.
- [113] DEY S, BHAT A, JANANI G, et al. Microfluidic human physiometric liver model as a screening platform for drug induced liver injury[J]. *Biomaterials*, 2024, 310: 122627.
- [114] ZHANG C J, MEYER S R, O'MEARA M J, et al. A human liver organoid screening platform for DILI risk prediction[J]. *Journal of Hepatology*, 2023, 78(5): 998-1006.
- [115] 中国生物工程学会. 器官芯片通用术语: T/CSB 0003—2024 [S]. 北京: 中国生物工程学会, 2024.
Chinese Society of Biotechnology. General terminology of organs-on-chips: T/CSB 0003—2024[S]. Beijing: Chinese Society of Biotechnology, 2024.
- [116] 中国生物工程学会. 器官芯片肝第1部分:模型构建规范: T/CSB 0005.1—2024[S]. 北京: 中国生物工程学会, 2024.
Chinese Society of Biotechnology. Organs-on-chips: liver—Part 1: Specification of model construction. : T/CSB 0005.1—2024[S]. Beijing: Chinese Society of Biotechnology, 2024.



通讯作者: 秦建华, 中国科学院大连化学物理研究所首席研究员, 博士生导师。研究方向为器官芯片、干细胞与类器官工程、疾病建模与创新药物评估。
E-mail: jhqin@dicp.ac.cn



第一作者: 陈汐玥, 博士研究生。研究方向为肝器官芯片、类器官及其生物医学应用研究。
E-mail: xiyue@dicp.ac.cn