



李亮博士, 现任南方科技大学医学院药理学系副研究员、博士生导师, 李亮实验室长期从事微生物-宿主互作及类器官研究, 近三年以通信作者身份在*Cell Host Microbe*(封面文章)、*Cell Res*、*Nat Metab*等顶刊发表多篇论文, 成果被AAAS、Science Daily等国际媒体广泛报道, 多项专利已转化。担任深圳市分析测试协会类器官与器官芯片专委会主任委员、中国食品药品企业质量安全促进会细胞医药分会副主任委员等学术职务, 主持重点研发专项课题、国家自然科学基金等项目。

<https://www.sustech.edu.cn/zh/faculties/liliang.html>

肝脏类器官在药物筛选中的前沿进展: 技术突破与临床转化

李星星 李亮*

(南方科技大学医学院药理学系, 粤港血管稳态与疾病研究高校联合实验室, 深圳 518000)

摘要 肝脏在药物代谢和毒性评估中至关重要, 传统的肝原代细胞和动物模型虽然广泛使用, 但在模拟人类肝脏对各种应激反应的复杂性方面存在显著局限。由人胚胎干细胞、成体干细胞、原代细胞或组织衍生的肝脏类器官可以模仿多种肝细胞类型、主要生理功能和结构特征, 在筛选有效药物方面展现出独特优势。该文系统综述了肝脏类器官在药物筛选领域的最新进展, 重点总结了类器官构建培养技术在药物筛选策略方面的关键突破; 进一步探讨了其在药物筛选中的应用现状, 并深入分析了当前临床转化过程中所面临的挑战与未来机遇, 以期为该领域的持续研究与临床转化提供理论参考和实践指引。肝脏类器官构建技术及其在药物筛选方面的应用虽取得显著进展, 但在标准化、成本效益及伦理监管等方面仍面临挑战, 未来需多学科融合推动其进一步发展与应用。

关键词 肝脏类器官; 药物筛选; 高通量技术; 临床转化; 毒性评估

Advancements in Liver Organoid Technology for Drug Screening: Progressing from Innovations to Clinical Applications

LI Xingxing, LI Liang*

(Department of Pharmacology, Joint Laboratory of Guangdong-Hong Kong Universities for Vascular Homeostasis and Diseases, School of Medicine, Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518000, China)

Abstract The liver is integral to drug metabolism and toxicity evaluation. Traditional models, such as primary liver cells and animal models, are widely used but have notable limitations in replicating the human liver's complex responses to diverse stressors. In contrast, liver organoids, derived from human embryonic stem cells, so-

收稿日期: 2025-06-13

接受日期: 2025-07-18

国家重点研发计划“基于干细胞技术的重大传染病临床救治方案研究”重点专项(批准号: 2022YFC2304400、2022YFC2304401)资助的课题

*通信作者。Tel: 0755-88015453, E-mail: lil@sustech.edu.cn

Received: June 13, 2025

Accepted: July 18, 2025

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2022YFC2304400, 2022YFC2304401)

*Corresponding author. Tel: +86-755-88015453, E-mail: lil@sustech.edu.cn

matic stem cells, and primary cells or tissues, can emulate various liver cell types, essential physiological functions, and structural characteristics, offering distinct advantages in screening effective drugs. This article provides an in-depth examination of the latest advancements in liver organoids for drug screening, focusing on innovations in organoid construction, culture methodologies, and drug screening technologies. This review systematically summarizes the latest advances in the application of liver organoids in drug screening, with a focus on key breakthroughs in organoid culture techniques and drug screening strategies. It further explores their current applications in drug screening and provides an in-depth analysis of the challenges and future opportunities in clinical translation, aiming to offer a comprehensive theoretical reference and practical guidance for ongoing research and clinical implementation in this field. Despite the significant advancements in liver organoid construction and its application in drug screening, challenges remain in standardization, cost-effectiveness, and ethics regulation.

Keywords liver organoids; drug screening; high-throughput technologies; clinical translation; toxicity evaluation

肝脏在药物代谢和毒性评估中扮演着关键角色。作为人体最大的实质性器官,肝脏含有丰富的药物代谢酶,如细胞色素P450家族等,参与药物的氧化、还原、水解等第I相生物转化反应,以及结合反应等第II相生物结合反应,从而决定药物的代谢命运^[1]。同时,肝脏也是许多药物毒性作用的靶器官,药物诱导的肝损伤(drug-induced liver injury, DILI)是药物研发失败和上市后撤药的重要原因之一^[2]。然而,传统的药物代谢和毒性评估模型存在诸多局限性^[3]。传统细胞模型,如人原代肝细胞(primary human hepatocytes, PHH),虽易于培养和操作,但增殖有限并缺乏体内肝脏细胞的复杂性和异质性,不能准确模拟肝脏的生理功能和药物代谢过程^[3]。例如,在人原代肝细胞中,药物代谢酶的表达和活性与体内实际情况存在差异,导致对药物代谢和毒性的预测不够准确,新药开发的成功率仅为8%^[2,4]。动物模型,如小鼠、大鼠等,虽然整体生理结构和功能相对完整,但种属差异使得其对药物的代谢和毒性反应与人类存在差异。据统计,基于动物模型预测人类药物反应的准确率仅在49%~61%,许多在动物模型中显示安全有效的药物,在人体临床试验中却因肝毒性导致失败^[5]。因此,开发更准确模拟人类肝脏功能的模型对于提高药物筛选准确率和安全性至关重要。

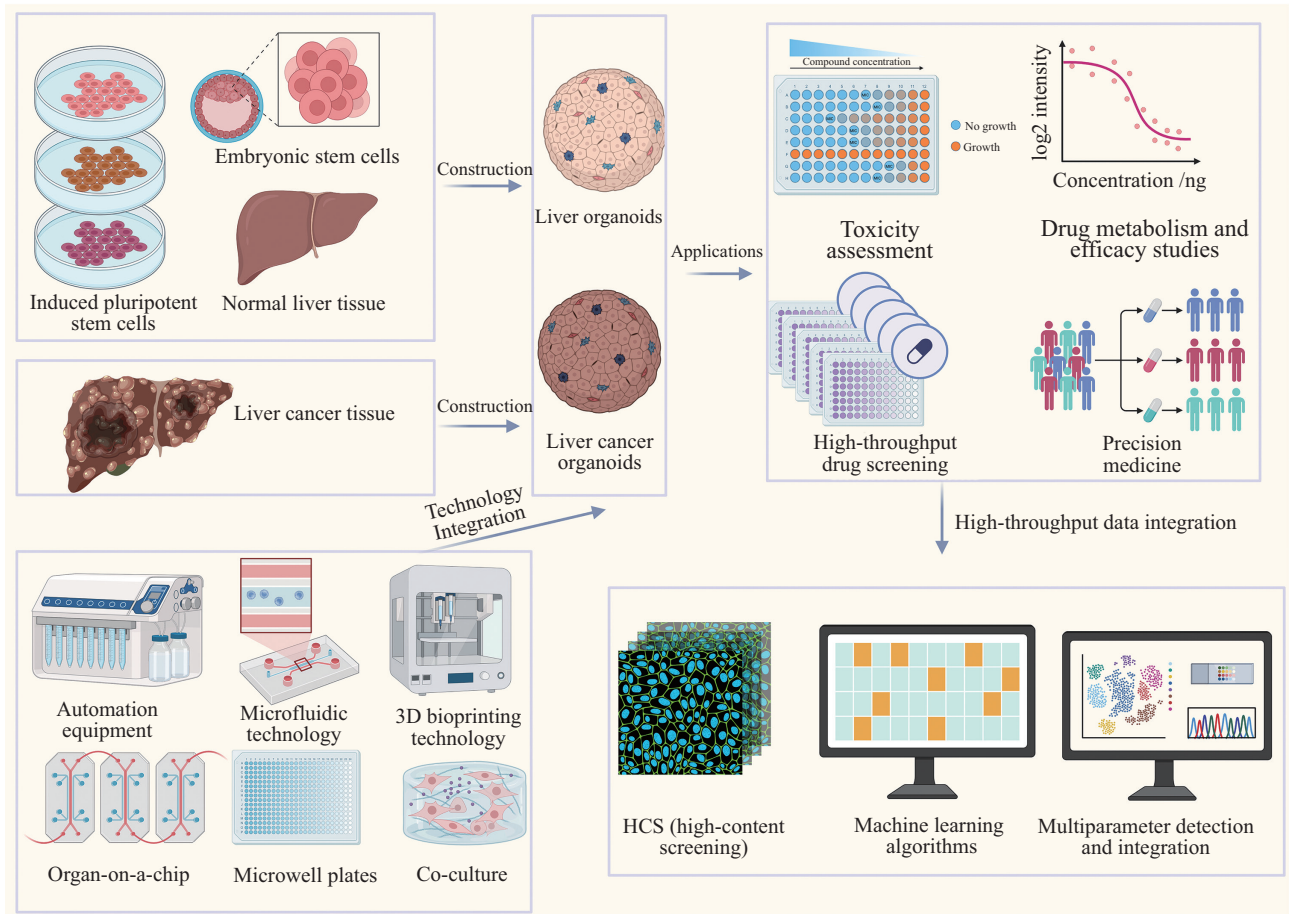
肝脏类器官是由干细胞或组织衍生的三维细胞结构,能模拟肝脏的多种细胞类型、生理功能和组织结构,为药物筛选提供了新的平台^[6]。本文通过深入探讨类器官在构建技术和筛选技术方面的前沿突破,以及在药物代谢、毒性评估及抗肿瘤药物筛

选等实际应用中的最新成果,强调其在药物筛选领域的创新性和重要意义。其中,肝脏类器官在药物筛选中的应用流程和技术整合概览见图1。同时,本文也进一步分析了肝脏类器官在临床转化过程中面临的挑战,为推动肝脏类器官技术从实验室走向临床应用提供了理论依据和实践指导,以期最终促进药物研发的效率和质量提升,并为肝脏类器官在药物筛选领域的进一步发展和临床应用提供理论依据和实践指导。

1 肝脏类器官构建技术前沿

1.1 干细胞来源

目前,肝脏类器官的构建主要由三种来源的干细胞分化而来,例如,人成体干细胞(human somatic stem cells, hSSCs)[包含肝祖细胞和富含亮氨酸重复序列的G蛋白偶联受体5(leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5, LGR5⁺)的专能干细胞]、诱导多功能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs),以及人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)^[7]。这三种不同的干细胞均可诱导分化的多种肝脏类器官,但在分化策略、细胞组成以及功能模拟等方面有所差异^[8]。肝祖细胞和LGR5⁺干细胞可以从受损和健康的肝组织分离,其中,LGR5⁺干细胞一般在受损的肝组织中被激活^[9]。这两种干细胞在含有R-spondin 1的培养基中可扩增形成胆管类器官,但其增殖能力有限,仅能维持数月^[9]。R-spondin 1的作用机制是通过Wnt信号通路上调LGR4/5/6配体的表达实现的^[10]。小分子抑制剂A83-01可特异性抑制TGF- β 的受体Alk 4/5/7,其可以



首先, 利用来自不同来源的干细胞构建正常肝脏和肝癌类器官模型。随后, 这些类器官被用于毒性评估、高通量药物筛选以及药物代谢和药效研究。通过整合自动化设备、微流控技术、3D打印技术和细胞共培养等先进技术, 支持肝脏类器官在高通量筛选和精准医疗中的应用。此外, 通过高内涵筛选技术、机器学习算法和多参数检测与整合等方法实现高通量数据的整合, 这些对于提高药物筛选的准确性和效率至关重要。Firstly, normal liver and liver cancer organoid models are constructed using stem cells from various sources. Subsequently, these organoids are utilized for toxicity assessment, high-throughput drug screening, and studies on drug metabolism and efficacy. The integration of advanced technologies such as automation equipment, microfluidic technology, 3D bioprinting, and co-culture supports the application of liver organoids in high-throughput screening and precision medicine. Furthermore, the integration of high-content screening technology, machine learning algorithms, and multi-parameter detection and integration enables high-throughput data analysis, which is crucial for enhancing the accuracy and efficiency of drug screening.

图1 肝脏类器官在药物筛选中的应用流程和技术整合概览(图片通过<https://BioRender.com>制作)
Fig.1 Overview of the Application Pipeline and Technology Integration of Liver Organoids in Drug Screening
(figure created in <https://BioRender.com>)

延长胆管类器官的培养时间。毛喉素能够上调干细胞LGR5⁺的表达和胆管标志物, 例如CK19。综上, 胆管类器官的长期扩增需要Wnt信号、cAMP的激活和TGF-β的抑制, 胆管类器官可以在体外和体内移植后转化为功能性的肝细胞^[11]。其中, 胆管类器官在含有Notch抑制剂DAPT^[9]、FGF 19^[12]和地塞米松^[13]的培养基中可被诱导分化为肝细胞上皮类器官, 若在分化前添加BMP7, 还能进一步加速肝细胞的成熟进程。2018年, HU等^[14]进一步补充了促进肝细胞命运分化的细胞因子, 这种新的培养条件能够以类似3D的培养方式扩增出小鼠和人的肝细胞, 而形成的肝

细胞类器官具有“葡萄串”外观, 其ALB分泌水平为人PHH的1/3~1/2。总之, hASCs的优势在于来源相对直接, 且不存在伦理问题和致癌风险。然而, 由成体干细胞分化的肝脏类器官仅含有单一的胆管和肝上皮细胞, 缺乏非实质细胞, 无法模拟肝脏类器官的全部功能^[15]。hASCs的获取通常也需要侵入性操作, 这导致其来源有限, 且随着供体年龄增长, 其增殖和分化能力会逐渐下降, 影响肝脏类器官的长期构建和应用^[16]。

hiPSCs诱导分化为肝脏类器官的过程较为复杂, 需体外精确调控多种信号通路, 且分化效率和成熟

度存在差异^[17]。目前, hiPSCs衍生肝脏类器官的最佳分化培养方案尚未形成共识。最常用的肝细胞定向分化方案借鉴了体内肝脏发育过程, 通常采用三步策略: 首先诱导 hiPSCs 分化为定形内胚层(definitive endoderm, DE), 随后定向分化为肝内胚层(hepatic endoderm, HE)祖细胞, 最后分化为较成熟的肝样细胞(hepatocyte-like cells, HLCs)^[18]。2019年, WU等^[19]利用Activin A与BMP4激活Nodal/BMP通路实现iPSC向内胚层定向分化^[20]; 随后通过FGF 4和BMP2诱导肝特化谱系; 继后经HGF、KGF、Oncostatin M与地塞米松联合胆固醇混合物成功构建含肝细胞与胆管细胞的肝胆上皮类器官。根据肝脏类器官的细胞来源, 我们将其分类为肝胆上皮类器官和多组织肝脏类器官^[21]。其中, 多组织肝脏类器官是通过来源于至少两个胚层的细胞共培养或hiPSCs的共分化建立而来。例如, OUCHI等^[22]开发了一种可重复的方法诱导hiPSCs分化为含肝细胞、星状细胞和内皮细胞及Kupffer细胞的多组织肝脏类器官。2023年, KIM等^[23]通过组装完全来源于hiPSCs的肝内胚层、肝星状细胞样细胞和内皮细胞, 生成了具有管腔状血管和胆管的多谱系肝脏类器官。在基因组和功能分析中, 与hASCs来源的肝上皮类器官相比, hiPSCs诱导的肝脏类器官表现出更成熟的肝组织表型^[24]。

hESCs具有强大的分化潜能, 理论上可分化为肝脏内各种细胞类型, 构建的肝脏类器官在细胞组成和功能上更接近真实肝脏, 其分化流程与hiPSCs相似。例如, WANG等^[25]依赖于独特定义的培养基, 可将hESCs从2D培养转变3D培养, 并分化为具有功能性肝细胞和胆管细胞的双能特性的肝脏类器官, 此类器官至少具有20代的扩增潜能。然而, hESCs的使用面临伦理限制, 且存在致癌风险, 限制了其广泛应用^[15,26]。

1.2 三维培养体系优化

肝脏类器官的生长需要一个支持其细胞增殖、黏附和分化的三维微环境。因此, 合适的肝细胞培养基质系统和培养方式对肝脏类器官的形成和功能成熟具有重要影响。在肝细胞培养基质方面, 天然来源的Matrigel是目前常用的基质, 它能为细胞提供类似于细胞外基质的微环境, 支持肝脏类器官的形成和生长^[14,24]。但Matrigel成分复杂且批次间存在差异, 影响肝脏类器官扩增的重复性和稳定性^[27]。另一种天然来源的确定成分水凝胶(defined hydrogels, DHs)^[28], 因可人为定制其化学和物理性质, 相比于

Matrigel, 其提高了实验的再现性。DH的成分主要由动物衍生的聚合物, 如胶原蛋白I、层粘连蛋白、明胶和纤维蛋白, 以及植物衍生的聚合物, 如壳聚糖、藻酸盐和琼脂糖等组成, 因其来源天然物质, 表现出较强生物相容性, 但也具有稳定性差、机械性能差和降解较快等缺点^[28]。

为解决这一问题, 合成水凝胶逐渐受到关注^[29]。例如聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)和聚异氰酸酯(polyisocyanide, PIC)等聚合物^[30], 这些材料性质稳定, 但却缺乏生物化学性质。目前主要通过功能化修饰或蛋白化修饰等方法对水凝胶进行靶向改造, 从而使其获得适宜的机械性能和特定的生物物理特性^[31]。例如, 研究人员通过调整合成水凝胶的刚度, 使其更好地匹配肝脏的生理水平, 并在涂有胶原蛋白I的PEG支架中成功构建了iPSC衍生的肝脏类器官^[32]; 与Matrigel相比, 这种水凝胶还能提供更长期的机械支持^[28]。

脱细胞支架是通过物理、化学或酶促方法从组织中消除细胞而获得的一种天然的细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 其保留了组织的完整3D结构、生化组成和生物活性, 为细胞附着、增殖和分化提供了最原始的生长环境^[33]。CHEN等^[34]成功获得了大鼠肝脏全脱细胞支架, 并用高活性原代胆管细胞对其进行再细胞化, 结果发现原代胆管细胞均匀分散在管腔内、保持持久的细胞活力及能够表达特异性胆管标志物。此外, 肝脱细胞支架可以通过酶或加热等处理为水凝胶, 该水凝胶保留了影响细胞行为的基本生化特征, 并在复杂和成熟肝脏类器官的培养中表现出一定的优势^[35]。目前, 肝脱细胞凝胶可作为液滴微流体、3D打印等应用的生物材料, 以更容易地促进细胞组分的整合^[36]。然而, 肝脱细胞基质的批次间变异性和免疫原性等问题, 也影响了构建复杂肝脏类器官的稳定性和精准性^[37]。

在培养方式上, 相比于传统的静态基质胶包埋培养, 旋转培养通过模拟微重力环境促进细胞聚集和组织形成, 可提高肝脏类器官的形成效率和结构完整性^[38]。使用旋转生物反应器培养的肝脏类器官, 与传统静态培养相比, 其白蛋白分泌量和药物代谢能力大大提高^[39]。此外, 采用悬浮法^[40]培养的肝胆类器官因操作简便高效, 在实现肝脏类器官工程化培养方面具有不可比拟的优势, 但培养的类器官有大小不均一、同质化较低等缺点。为突破这一瓶颈,

联合类器官芯片和微流控技术,即借助微孔或微柱阵列结构的微流控平台可以实现肝脏类器官的高通量及同质化培养。例如,TAKEBE等^[41]提出了一种基于全孔阵列培养平台的独特方法,用于大规模生产同质化hiPSC衍生的肝芽,实现了临床规模(>10⁸)级细胞产量,促进了临床和制药应用^[42]。

3D生物打印技术是医学、生命科学、计算机科学、机械和材料科学等多学科整合创新技术,其在组织和器官工程中显示出巨大潜力,可精确控制细胞及其周围微环境的空间分布,凭借其高通量自动化系统的优势,3D生物打印的肝脏类器官在可重复性和稳定性方面要优于传统类器官培养方式^[43]。然而,在追求支架刚度和结构稳定性平衡的过程中,细胞迁移和延伸能力受到限制,从而导致肝细胞相互作用的丧失。因此,尽管当前3D生物打印技术的

结构复杂性和分辨率已显著提升,但要完全复制天然组织的细胞多样性及复杂微结构,仍面临巨大挑战^[44]。综上,肝脏类器官目前在培养基质和培养方式方面各有优缺点(表1),亟需科学家们进一步优化和改进。

1.3 细胞共培养与微环境模拟

肝脏由肝细胞和肝非实质细胞组成,如肝窦内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cells, LSECs)、肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)和枯否细胞(Kupffer cells, KCs)等,它们通过直接或间接相互作用共同调节肝脏功能^[65]。传统单一培养的3D肝细胞模型无法模拟实质细胞与非实质细胞间的复杂相互作用,而3D共培养模型则能提供更精准的药物人体反应预测。例如,与肝癌细胞的2D或3D单一培养物相比,AL HROUT等^[66]构建的肝癌细胞和成纤维

表1 目前肝脏类器官的三维培养体系及其优劣性
Table 1 Current 3D culture systems for liver organoids: pros and cons

优化方向 Optimization focus	类型/方法 Type/method	优势 Advantages	局限性 Limitations	参考文献 References
Culture matrix	Matrigel	Supports organoid formation and growth, high bioactivity	Complex composition, high batch-to-batch variation affecting reproducibility and stability; expensive; tumor-derived nature limits applications	[27,45-46]
	Defined hydrogels	High tunability improves experimental reproducibility; good biocompatibility	Poor stability, weak mechanical properties, fast degradation	[47-49]
	Synthetic hydrogels	High stability; long-term mechanical support; precise control over physical/biochemical properties	Lacks natural biochemical signals; requires modification to enhance bioactivity	[30,50-51]
	Decellularized scaffolds	Preserves intact ECM structure and bioactivity; provides the closest approximation to the <i>in vivo</i> microenvironment	High batch variability; risk of immunogenicity; difficulty in vascular reconstruction	[34,52-53]
Culture method	Rotating bioreactors	Improves organoid formation efficiency; enhances albumin secretion and drug metabolism capacity in liver organoids	Labor-intensive and multi-step manual operation; increases risk of organoid variability and heterogeneity	[54-56]
	Suspension culture	Facilitates relatively higher organoid throughput using hanging drop or non-adherent surfaces	Labor-intensive and multi-step manual operation; inconsistent organoid size; low homogeneity	[54-56]
	Microfluidic platforms	High-throughput, uniform; enhanced nutrient delivery and shear stress stimulation; supports multi-organ interactions	Complex chip design; higher cost	[57-59]
	3D bioprinting	High-precision spatial control; automated high-throughput; improved reproducibility; allows design of complex physiological structures	Limited printing resolution; risk of cell damage; insufficient bioink development; difficulty in fully replicating cellular diversity and microstructure	[60-62]
	Organ-on-a-chip	Enhances organoid maturity; simulates physiological shear stress; studies inter-organ metabolism/toxicity	Chip designs need organ-specific matching; high complexity in system integration	[42,63-64]

细胞的3D共培养肝癌类器官模型,表现出与肝细胞癌发展相关的基因和蛋白质的表达量增加以及预后不良,其更接近于体内肝细胞癌的发展特征。此外,MANNAERTS等^[67]将HSC和肝细胞共培养后成功构建肝纤维化体外模型。此外,LSEC和KC也参与了肝脏纤维化过程的调控。通过将这些不同类型的肝非实质细胞和肝细胞整合到三维环境中共培养,能够构建更具代表性的肝纤维化体外模型^[68]。3D细胞共培养肝模型是用于临床前药物筛选的有前景的工具,因其能够概括复杂的细胞通讯和肝脏表型,考虑到不同肝非实质细胞诱导的肝细胞功能水平不同,可根据研究目的选择性地构建合适的肝细胞共培养模型。

肝脏多细胞共培养技术的发展,促使人们开发合适的肝细胞外基质培养体系以模拟其复杂微环境。在此过程中,3D生物打印及微流控技术因能有效模拟肝脏的血流、氧气与营养物质梯度等物理微环境而展现出显著优势。例如,BOUWMEESTER等^[60]采用挤出式生物打印技术,以GelMA水凝胶为生物墨水,打印具有200~400 μm 孔道结构的肝组织模型。该模型通过设计的孔道网络模拟了肝窦状隙结构,实现了高效分子扩散,对营养物质的运输和氧气梯度进行了模拟。YIN等^[63]开发了四层微流控芯片,整合了肝脏类器官与心脏类器官,此模型的上层肝室模拟药物首过代谢,下层心肌微柱阵列实时监测心搏功能,双腔室通过微通道连接实现代谢物传递,研究标明抗抑郁药氯米帕明经肝代谢后,其代谢物使心肌细胞出现了死亡,心搏频率降低了一半左右,成功模拟了临床上的心脏毒性体征。

2 肝脏类器官高通量药物筛选技术突破

2.1 微流控与自动化平台

高通量药物筛选是一种大规模、快速筛选药物化合物的技术,旨在从海量的化合物库中高效地发现具有潜在药理活性的物质^[69]。肝脏类器官因定义不明确的肝ECM系统和静态培养环境等限制药物筛选的高通量和准确性,近年来,微流控芯片和自动化系统的结合在提高肝脏药物筛选通量和准确性方面具有显著优势。微流控芯片通过微通道网络实现药物浓度梯度生成和细胞培养的集成化,可在单次实验中同时筛选数百至数千个药物样本。ZHAI等^[70]开发了一种数字微流控系统,通过创新的芯片设计和

控制结构,实现了药物与细胞悬浮液的混合和药物浓度梯度的形成,并将其应用于细胞培养。该系统在减少细胞和药物用量以及降低空间需求方面优于传统的96孔板。SHINOZAWA等^[71]开发了一种基于3D肝脏类器官的高通量毒性筛选平台,用238种药物化合物对其进行了测试。基于胆汁酸转运活性和细胞活力的结果说明了该平台具有较高的预测准确性,灵敏度达到88.7%,特异性为88.9%。然而,由于目前无标准化的肝脏类器官细胞外培养基质和培养方法,肝脏类器官在药物筛选应用上的可重复性和可扩展性尚未得到满足。自动化系统的引入是推动药物筛选标准化的重要一步,它有效减少了人为误差,显著提高了实验的重复性与可靠性。例如,WU等^[72]开发了自动化机器人系统(automated robotic interface for assays, ARIAs),该系统被用于药物发现中的物理化学性质测定。ARIA通过自动化样品制备和测定流程,显著提高了样品通量(6到10倍),并减少了数据变异性,提升了数据质量。此外,ARIA系统生成的高质量数据能够有效支持机器学习(machine learning, ML)模型的训练和更新,为药物开发中的物理化学性质预测提供了更可靠的基础。

2.2 图像分析与人工智能算法

药物筛选的关键在于评估药物作用后的细胞状态,而经典方法(如ATP酶活性法)仅能检测终点效应,而非早期反应,因此无法完整揭示药物的作用机制。而高内涵筛选技术(high-content screening, HCS)可以通过自动化高通量摄影(如高速显微成像)快速收集大量数据,在单细胞水平上提供高分辨率、高通量和高信息量的多参数数据,如细胞形态、药物代谢酶的表达定位、细胞内信号通路的激活等,当其与药物递送装置结合时可实时观察细胞对药物的即时反应^[73]。2023年,ZHANG等^[74]建立基于人源肝脏类器官(human liver organoids, HLOs)的高通量DILI风险评估平台,借助HCS,使用CellProfiler工具提取了845个形态/荧光特征(如核形态、线粒体质量、脂滴密度),完成了单细胞分辨率的多维度毒性机制解析,但是HCS有时会出现成像焦面不佳等问题。机器学习算法可对前期获取的大量图片数据进行进一步分析和挖掘,建立药物作用的预测模型。例如,2025年,TAN等^[75]开发了名为DILITracer的创新型人工智能(artificial intelligence, AI)模型,利用肝脏类器官的时空明场图像特征,结合临床DILI等级数据,实现了对

药物肝毒性风险(高、低、无)的准确预测(总体准确率 82.34%), 为药物研发和筛选中的临床前肝毒性评估提供了一种高效可靠的替代方法。

2.3 多参数检测与数据整合

整合多种检测方法全面评估药物对肝脏的影响是药物筛选的关键。传统的药物筛选通常仅关注单一指标, 如细胞活力或特定代谢产物的水平, 难以全面反映药物对肝脏的综合作用。而多参数检测要求同时测定多个指标, 包括药物代谢酶活性、细胞毒性、炎症因子表达、氧化应激水平、基因表达及蛋白水平检测等, 深入探究药物作用的分子机制, 从而更全面地评估药物的安全性和有效性。2023年, LALONE等^[76]开发的qRamanomics——一种基于共聚焦拉曼光谱成像的定量化学计量表型分析平台, 为iPSC衍生的肝脏类器官的质量评估和药物肝毒性检测等提供了全新的无标记、多参数检测和分析工具。数据整合则是将多参数检测获得的数据进行综合分析, 挖掘数据之间的潜在关系。通过建立数学模型或使用生物信息学工具, 可将不同检测方法得到的数据整合在一起, 形成一个全面的药物作用图谱。2023年, BAI等^[77]系统综述了AI与类器官技术的融合, 重点聚焦于AI如何优化类器官的构建策略、多尺度数据分析及临床应用, 旨在解决传统类器官研究中的效率低、成本高、数据解析复杂等问题。例如, 利用UnitedNet整合单细胞多组学数据, 可以揭示基因表达与表型的深层关联; 此外, 借助MOrgAna软件还能自动化量化类器官的形态与荧光特征。这些方法共同为提升肝脏类器官高通量药物筛选的效率与准确性提供了新策略和新方向。

3 肝脏类器官在高通量药物筛选中的应用

3.1 药物毒性评估

在药物研发和评估过程中, 肝毒性评估至关重要。传统动物实验存在成本高、周期长及种属差异等问题, 肝脏类器官在肝毒性筛查方面展现出巨大潜力。研究表明, 通过检测化合物对肝细胞的损伤指标, 如ALT/AST释放、脂质堆积、线粒体毒性等, 可有效评估药物的肝毒性^[78]。以对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)为例, 多项研究利用肝脏类器官深入探究其肝毒性机制。MA等^[79]构建基于人诱导肝细胞(human-induced hepatocytes, hiHeps)的3D生物打印肝脏模型(humanized 3D bioprinted livers,

h3DPLs), 该模型对APAP等肝毒性物质敏感性增强, 能准确反映利福平对CYP2E1水平及APAP肝毒性的影响, 为研究药物诱导的肝损伤提供了有前景的平台。NOH等^[80]开发了一种基于氨基酸(amino acids, AAs)代谢分析的无创肝毒性评估方法, 利用人诱导多能干细胞衍生的肝脏类器官(human hepatic organoids, hHOs)培养基, 鉴定出了4种AA(天冬氨酸、精氨酸、谷氨酰胺、苯丙氨酸)和8种AA比值(Asp/Phe、Arg/Phe、Asp/Arg、Phe/Arg、Gln/Asp、Arg/Asp、Phe/Asp和Arg/Tyr)作为标准化肝毒性生物标志物。通过同位素稀释质谱技术对培养上清液进行非破坏性定量分析, 该策略无需破坏类器官结构, 同时克服了传统细胞活性检测的批次间变异问题, 为药物肝毒性筛选建立了高可比性的标准化评估体系。

另外, 胆汁淤积是药物性肝损伤的重要类型之一, 准确预测药物引发胆汁淤积的风险对药物研发意义重大。肝脏类器官凭借其独特的胆管网络结构, 为胆汁淤积预测和机制研究提供了新途径。药物诱导的胆汁淤积(drug-induced cholestasis, DIC)与胆汁酸稳态失衡密切相关。例如, WANG等^[81]利用人肝脏类器官模型揭示补骨脂素(bavachinin, BVC)通过下调BAAT基因的表达抑制甘氨酸(glycocholic acid, GCA)合成, 进而诱发胆汁淤积, 并证实通过上调BAAT的表达或补充GCA可有效缓解肝毒性。

3.2 药物代谢与药效研究

代谢稳定性是药物研发的关键特性, 它影响药物的药代动力学特征及疗效。准确量化药物代谢产物, 对于评估药物代谢稳定性至关重要, 而液相色谱-质谱联用(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)技术在其中发挥着重要作用。研究表明, 代谢稳定性研究有助于理解药物在体内的代谢过程及潜在风险。例如, 通过LC-MS分析CYP450代谢活性, 可深入了解药物的代谢途径和稳定性^[82]。LEUNG等^[83]开发了一种高通量集成测定法, 能同时进行肝细胞代谢稳定性评估和代谢物谱分析, 该方法通过自动化液体处理系统、LC-HRMS系统、自动化数据分析和报告系统及流线型自动批处理软件, 提高了筛选效率, 可同时测定代谢稳定性和代谢物谱, 为早期药物发现中的先导优化提供了有效手段。MO-STAFa等^[84]利用LC-MS/MS方法对多种药物进行代谢稳定性评估, 如对新型FGFRs抑制剂infigratinib的研究, 通过该方法测得其在人肝微粒体中的固有清

除率为 $23.6 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, 体外半衰期为29.4 min, 表明其具有中等提取率和较好的预测口服生物利用度。整合肝脏类器官和高通量集成系统(含LC-MS分析)为药物代谢稳定性研究的精准性和可比性方面提供良好的应用前景。

肝纤维化肝脏疾病严重威胁人类健康, 开发有效的抗纤维化药物迫在眉睫。肝脏类器官模型为筛选此类药物提供了有力工具。在抗纤维化药物开发方面, QIAN等^[85]在基线无/轻度纤维化的丙型肝炎病毒和非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)患者队列($n=421$)中定义纤维化进展特征基因谱(fibrosis progression signature, FPS), 用于预测5年内纤维化进展, 并在多种纤维化疾病患者中进行验证, 通过对临床纤维化肝组织的体外抗纤维化药物评估, 确定了基于表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)的合理联合疗法, 为抗纤维化药物开发提供了新思路。目前, 基于肝脏类器官的肝纤维化模型已相继建立, 这为预测和筛选潜在的抗纤维化药物提供了有力的工具^[86]。

3.3 疾病建模与精准医疗

患者来源的肝脏类器官保留了个体的遗传背景, 包括致病的突变基因, 这为个性化医学和药物研发效率提供有力的工具。例如, 遗传性肝病严重影响患者生活质量和寿命, $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶缺乏症($\alpha 1$ -antitrypsin deficiency, ATD)是常见的遗传性肝病之一。ATD相关肝病, 例如肝脂肪变性、肝纤维化、肝硬化或肝癌, 主要由 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶Z型突变体蛋白($\alpha 1$ -antitrypsin Z-mutant protein, ATZ)在肝细胞内病理性积累导致, Z突变改变了 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶($\alpha 1$ -antitrypsin, AAT)蛋白的正常折叠并引发其聚合^[87]。然而, 多项研究发现ATD患者来源肝脏类器官模型可模拟ATD的病理过程^[88-89], 这为理解AAT聚合的分子机制、ATD疾病进展及新疗法提供新模型。例如, SARA等^[88]通过对比携带SERPINA1基因Z突变(Glu342Lys)与正常M等位基因的HepG2细胞和肝脏类器官模型, 系统揭示了ATZ的积累与脂代谢紊乱密切相关。

除了遗传性肝病外, NAFLD已成为慢性肝病的主要原因。NAFLD包括从单纯性脂肪变性到非酒精性脂肪炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 再到肝硬化和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发展的一系列疾病。OUCHI等^[22]使用11种不同的健康和

患病iPSC构建的多组织肝脏类器官。这一类器官与游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)混合后, 可模拟出脂肪性肝炎样病理学(包括脂肪变性、炎症和纤维化)的渐进性发展过程。另外, 肝脏类器官的发展为肝炎病毒的精准治疗提供可能。NIE等^[90]证明, 人iPSC来源的肝类器官在感染HBV后能完整重现病毒生命周期及病毒诱导的肝功能障碍, 该模型为开发病毒性肝炎的个体化治疗提供了有效体外平台。

肝癌是全球范围内常见的恶性肿瘤, 死亡率高。肝癌类器官因其能保留肿瘤异质性, 在化疗药物敏感性测试方面具有重要价值, 为肝癌精准治疗提供了有力支持。研究表明, 肝癌类器官可准确反映原发性肝癌的遗传和分子特征。YANG等^[91]建立了包含399个肿瘤类器官的原发性肝癌生物样本库, 这些类器官重现了亲本肿瘤的组织病理学和基因组景观, 对七种临床相关药物的敏感性测试结果与体内模型及患者反应相符, 通过整合分析剖析了原发性肝癌的异质性, 并鉴定和验证了预测药物反应的多基因表达特征, 可以对原发性肝癌患者进行分层, 为临床治疗提供了指导。LI等^[92]对原发性肝癌患者来源的类器官进行药物敏感性测试, 发现不同类器官对药物的反应存在显著异质性, 部分药物在大多数类器官中显示出至少中等程度的活性, 这些药物值得进一步考虑作为全身或局部治疗药物, 为肝癌的个性化治疗提供了潜在选择。

4 肝脏类器官在临床转化中面临的机遇和挑战

4.1 标准化与质量控制

在肝脏类器官构建和应用中, 缺乏标准化是一个突出问题。目前, 不同实验室在肝脏类器官的构建方法、培养条件、检测指标等方面存在较大差异, 导致实验结果的重复性和可比性较差。例如, 在肝脏类器官的培养过程中, 培养基的配方、生物材料的选择以及培养时间等因素都会影响类器官的形成和功能, 而这些因素在不同实验室之间缺乏统一标准, 使得研究结果难以相互验证和比较^[26]。为解决这一问题, 需要建立标准化的操作流程和质量控制体系。制定统一的肝脏类器官构建和培养标准, 包括细胞来源的选择、培养条件的优化、生物材料的质量控制等方面。同时, 建立标准化的检测指标和评价方法, 确保实验结果的准确性和可比性。例如,

制定肝脏类器官药物代谢酶活性、细胞毒性等指标的统一检测方法和评价标准,有助于提高研究的可靠性和可重复性。此外,加强实验室之间的交流与合作,共同推动肝脏类器官标准化进程,也是解决这一问题的重要途径。

4.2 成本效益与可扩展性

肝脏类器官技术的成本和经济效益是影响其广泛应用的重要因素。目前,肝脏类器官的构建和培养需要使用一些昂贵的生物材料(如Matrigel)、生长因子和仪器设备,这导致成本较高。例如,Matrigel的价格相对昂贵,且用量较大,增加了实验成本。同时,构建和培养肝脏类器官需要专业的技术人员和较长的时间,进一步提高了成本投入^[1]。为提高成本效益和可扩展性,可采取以下策略,研发低成本、高性能的生物材料和培养基,替代昂贵的现有材料。例如,开发基于天然生物聚合物的生物材料,其来源广泛、成本低廉,且具有良好的生物相容性和支持细胞生长的能力。优化肝脏类器官的构建和培养方法,提高效率,缩短培养时间。例如,通过改进诱导分化方案,可将iPSC分化为肝脏类器官的时间从数周缩短至数天,降低时间成本。此外,实现肝脏类器官的大规模培养和高通量筛选,可降低单位成本,提高经济效益。利用微流控芯片、自动化生物反应器等技术,可实现肝脏类器官的高通量培养和药物筛选,提高生产效率和可扩展性。

高通量筛选与肝脏类器官结合存在诸多技术难题,其中自动化操作的兼容性是关键问题之一。肝脏类器官的培养和操作相对复杂,需要特殊的培养条件和处理方法,而现有的高通量筛选设备和技术往往是基于传统细胞模型或简单生物体系设计的,难以直接适用于肝脏类器官。例如,在自动化液体处理系统中,如何精确地对肝脏类器官进行液体操作,同时避免对其结构和功能造成损伤,是一个亟待解决的问题。在检测设备方面,如何实现对肝脏类器官内多种生物标志物的高通量、高灵敏度检测,也是当前面临的挑战。此外,将肝脏类器官整合到高通量筛选流程中,还需要解决数据采集、分析和管理等方面的技术问题,以确保筛选过程的高效性和准确性^[93]。

4.3 监管与伦理考量

肝脏类器官在临床转化中面临着监管政策和伦理问题。在监管政策方面,目前缺乏针对肝脏类器官用于药物筛选和临床治疗的明确监管指南。肝

脏类器官作为一种新兴技术,其质量控制、安全性评价和临床应用的规范尚未完善,这给其临床转化带来了一定的障碍^[94]。为解决监管问题,需要相关部门尽快制定和完善监管政策,明确肝脏类器官的质量标准、安全性评价方法和临床应用审批流程,确保其在药物筛选和临床治疗中的安全性和有效性。同时,加强对肝脏类器官研究和应用的监管力度,规范研究和应用行为。在伦理方面,肝脏类器官的构建可能涉及人类胚胎干细胞或患者的体细胞,存在一定的伦理争议。例如,使用胚胎干细胞构建肝脏类器官面临伦理限制,而使用患者体细胞时,需要确保患者的知情同意和隐私保护。2025年4月,由国家科技伦理委员会生命科学伦理分委员会制定的《人源类器官研究伦理指引》,为促进类器官相关基础研究的规范化和健康发展提供指导文件^[95]。此文件详细界定了类器官相关定义,明确了有益、控制风险、尊重自主、科学必要和公平公正五项基本原则,涵盖了科学价值、合法合规、伦理审查、知情同意、人员设施、资源管理、数据要求和国际合作等一般要求,并对脑类器官、类器官-嵌合体、人干细胞胚胎模型研究等提出了特殊要求,同时强调了科普宣传工作。因此,我们需要确保肝脏类器官的研究和应用符合伦理原则,也要加强公众对肝脏类器官技术的了解和认知,促进公众参与伦理讨论,也是解决伦理问题的重要环节。目前,肝脏类器官在临床转化研究中的机遇与挑战总结见表2。

5 讨论与展望

肝脏类器官在药物筛选领域展现出显著的技术突破和独特优势,但也面临诸多挑战。目前,肝脏类器官的标准化与质量控制缺乏统一规范,成本效益与可扩展性有待提高,监管与伦理考量也存在政策和伦理争议。不过,未来肝脏类器官构建技术有望朝着更加精准、高效和标准化的方向发展。通过对肝脏发育生物学的深入研究,有望实现对肝脏类器官细胞组成和组织结构的精确调控,使其更准确地模拟人体肝脏的生理结构和功能。例如,利用基因编辑技术,如CRISPR/Cas9系统,可精确调控肝脏类器官中特定基因的表达,以优化其代谢功能或增强对药物的反应能力。同时,通过微流控技术或3D打印技术等开发新的细胞培养技术和生物材料,能够进一步提高肝脏类器官的构建效率和产量。此外,

表2 肝脏类器官临床转化研究中的机遇与挑战评估

Table 2 Assessment of opportunities and challenges in liver organoid clinical translational research

分类 Category	机遇 Opportunities	挑战 Challenges	参考文献 References
Standardized QC	Unified operational procedures and QC systems enhance experimental reproducibility	Significant methodological variations between labs, lack of unified standards	[26,94]
Cost & scale	Develop low-cost materials and automation technologies to promote scaled production	Current materials (e.g., Matrigel) are expensive with long culture cycles	[1,72]
Regulation & ethics	Clear regulatory policies accelerate clinical translation	Lack of organoid regulatory framework, ethical controversies over embryonic stem cells	[26,94]
Multidisciplinary integration	Integrate bioengineering, pharmacy, and medicine to optimize technology development	Insufficient compatibility of high-throughput equipment with complex organoid models	[96-97]
Precision medicine	Liver cancer organoids retain tumor heterogeneity, supporting personalized drug screening	High difficulty in fully simulating the <i>in vivo</i> microenvironment and cell-cell interactions	[91-92]
Technological innovation	Microfluidics, 3D bioprinting, and AI improve drug screening efficiency	Difficulty in balancing scaffold stiffness and cell function in bioprinting	[41,44]

建立并完善统一的构建标准和质量控制体系，可确保不同实验室构建的肝脏类器官具有可比性和一致性，从而促进肝脏类器官在高通量药物筛选中的广泛应用^[98]。

高通量筛选技术与肝脏类器官结合将涌现出更多新方法。一方面，开发更适合肝脏类器官的高通量检测技术至关重要。基于纳米传感器或微阵列技术的检测方法，能够实现对肝脏类器官内多种生物标志物的实时、原位、高通量检测。另一方面，利用人工智能和机器学习算法，对高通量筛选过程中产生的海量数据进行深度分析和挖掘，可提高筛选效率和准确性。例如，通过建立药物反应预测模型，根据肝脏类器官对药物的反应数据，预测药物在人体中的疗效和毒性，为药物研发提供更有针对性的指导^[98]。

肝脏类器官与其他器官类器官的协同应用存在多种模式和显著优势。一种模式是构建多器官类器官芯片，借这一体外平台来研究药物在不同器官之间的代谢、转运和相互作用，可以更全面地评估药物的药代动力学和药效学特性。例如，SKARDAL等^[64]使用类器官芯片技术成功整合了六种不同的生物工程组织模型(肝脏、心脏、血管系统、肺、睾丸和结肠)，用来测试因不良反应而撤回的药物。研究发现，这一“芯片上的身体”系统可以模拟跨多个组织的药物反应串扰，代表了用于药物筛选的更相关的生理模型，在降低新药批准相关成本和失败率方面具有重要意义。其中，肝脏类器官在“芯片上的身体”这一系统上，不仅是药物代谢的核心引擎，更

是毒性预测和系统稳态调节的关键枢纽，其代谢功能的精准模拟为临床前药物安全性提供了不可替代的生理相关性。

在肝脏类器官高通量药物筛选领域，生物工程、药学、医学等多学科具有广阔的合作前景。生物工程领域可以为肝脏类器官的构建提供先进的技术和材料，如开发新型的生物支架材料，优化细胞培养微环境，提高肝脏类器官的质量和稳定性。药学专业人员能够基于肝脏类器官的特点，设计更合理的药物筛选方案，深入研究药物的作用机制和代谢过程，为新药研发提供理论支持。医学领域则可以提供临床样本和病例数据，帮助验证肝脏类器官筛选结果的临床相关性，加速药物从实验室到临床的转化。通过多学科的紧密合作，整合各学科的优势资源，有望推动肝脏类器官在高通量药物筛选中的应用取得突破性进展^[96]。

此外，肝脏类器官在精准医学中的应用也将不断拓展。它能够提供更真实的疾病模型，反映患者个体的遗传和生物学特性，使得精准医学不再仅仅依赖于基因检测，而是从细胞和组织层面深入了解疾病的发生发展机制。类器官的高通量药物筛选能力可以快速为患者找到最有效的治疗药物，避免了传统试错法治疗的时间和经济成本。类器官技术与多组学技术的结合，如基因组学、转录组学、蛋白质组学等，能够全面解析疾病的分子机制，为精准医学提供更丰富的信息，从而制定更加精准、个性化的治疗方案，提高治疗效果，降低医疗成本，推动精准医学从理论走向实践，为患者带来更多的福祉^[99]。

参考文献 (References)

- [1] SHAO W, XU H, ZENG K, et al. Advances in liver organoids: replicating hepatic complexity for toxicity assessment and disease modeling [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2025, 16(1): 27.
- [2] KARABICICI M, AKBARI S, ERTEM O, et al. Human liver organoid models for assessment of drug toxicity at the preclinical stage [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2023, 23(14): 1713-24.
- [3] KAUR S, KIDAMBI S, ORTEGA-RIBERA M, et al. *In vitro* models for the study of liver biology and diseases: advances and limitations [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2023, 15(3): 559-71.
- [4] KIM E, YANG J, PARK S, et al. Factors affecting success of new drug clinical trials [J]. *Ther Innov Regul Sci*, 2023, 57(4): 737-50.
- [5] SERRAS A S, RODRIGUES J S, CIPRIANO M, et al. A critical perspective on 3D liver models for drug metabolism and toxicology studies [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 626805.
- [6] BROOKS A, LIANG X, ZHANG Y, et al. Liver organoid as a 3D *in vitro* model for drug validation and toxicity assessment [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 169: 105608.
- [7] SAKABE K, TAKEBE T, ASAI A. Organoid medicine in hepatology [J]. *Clin Liver Dis*, 2020, 15(1): 3-8.
- [8] LIU S, CHENG C, ZHU L, et al. Liver organoids: updates on generation strategies and biomedical applications [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2024, 15(1): 244.
- [9] 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): 247-50.
- [10] SATO T, VRIES R G, SNIPPERT H J, et al. Single LGR5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche [J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 262-5.
- [11] 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.
- [12] WU A L, COULTER S, LIDDLE C, et al. FGF19 regulates cell proliferation, glucose and bile acid metabolism via FGFR4-dependent and independent pathways [J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17868.
- [13] RASHID S T, CORBINEAU S, HANNAN N, et al. Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(9): 3127-36.
- [14] HU H, GEHART H, ARTEGANI B, et al. Long-term expansion of functional mouse and human hepatocytes as 3D organoids [J]. *Cell*, 2018, 175(6): 1591-606.e19.
- [15] PRIOR N, INACIO P, HUCH M. Liver organoids: from basic research to therapeutic applications [J]. *Gut*, 2019, 68(12): 2228-37.
- [16] BROUTIER L, ANDERSSON-ROLF A, HINDLEY C J, et al. Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation [J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(9): 1724-43.
- [17] OLGASI C, CUCCI A, FOLLENZI A. iPSC-derived liver organoids: a journey from drug screening, to disease modeling, arriving to regenerative medicine [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17): 6215.
- [18] MAEPA S W, NDLOVU H. Advances in generating liver cells from pluripotent stem cells as a tool for modeling liver diseases [J]. *Stem Cells*, 2020, 38(5): 606-12.
- [19] WU F, WU D, REN Y, et al. Generation of hepatobiliary organoids from human induced pluripotent stem cells [J]. *J Hepatol*, 2019, 70(6): 1145-58.
- [20] TEO A K, ALI Y, WONG K Y, et al. Activin and BMP4 synergistically promote formation of definitive endoderm in human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2012, 30(4): 631-42.
- [21] MARSEE A, ROOS F J M, VERSTEGEN M M A, et al. Building consensus on definition and nomenclature of hepatic, pancreatic, and biliary organoids [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(5): 816-32.
- [22] OUCHI R, TOGO S, KIMURA M, et al. Modeling steatohepatitis in humans with pluripotent stem cell-derived organoids [J]. *Cell Metab*, 2019, 30(2): 374-84.e6.
- [23] KIM H J, KIM G, CHI K Y, et al. Generation of multilineage liver organoids with luminal vasculature and bile ducts from human pluripotent stem cells via modulation of Notch signaling [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1): 19.
- [24] MUN S J, RYU J S, LEE M O, et al. Generation of expandable human pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like liver organoids [J]. *J Hepatol*, 2019, 71(5): 970-85.
- [25] WANG S, WANG X, TAN Z, et al. Human ESC-derived expandable hepatic organoids enable therapeutic liver repopulation and pathophysiological modeling of alcoholic liver injury [J]. *Cell Res*, 2019, 29(12): 1009-26.
- [26] YANG R, QI Y, ZHANG X, et al. Living biobank: standardization of organoid construction and challenges [J]. *Chin Med J*, 2024, 137(24): 3050-60.
- [27] HUGHES C S, POSTOVIT L M, LAJOIE G A. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture [J]. *Proteomics*, 2010, 10(9): 1886-90.
- [28] ZHAO J, ZHI Y, REN H, et al. Emerging biotechnologies for engineering liver organoids [J]. *Bioact Mater*, 2025, 45: 1-18.
- [29] SHAO Y, WANG J, JIN A, et al. Biomaterial-assisted organoid technology for disease modeling and drug screening [J]. *Mater Today Bio*, 2025, 30: 101438.
- [30] YUAN H, LIU K, CÓNDROR M, et al. Synthetic fibrous hydrogels as a platform to decipher cell-matrix mechanical interactions [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120(15): e2216934120.
- [31] WU Q, LIU J, WANG X, et al. Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects [J]. *Biomed Eng Online*, 2020, 19(1): 9.
- [32] NG S S, SAEB-PARSY K, BLACKFORD S J I, et al. Human iPS derived progenitors bioengineered into liver organoids using an inverted colloidal crystal poly (ethylene glycol) scaffold [J]. *Biomaterials*, 2018, 182: 299-311.
- [33] FU R H, WANG Y C, LIU S P, et al. Decellularization and recellularization technologies in tissue engineering [J]. *Cell Transplant*, 2014, 23(4/5): 621-30.
- [34] CHEN J, MA S, YANG H, et al. Generation and metabolomic characterization of functional ductal organoids with biliary tree networks in decellularized liver scaffolds [J]. *Bioact Mater*, 2023, 26: 452-64.
- [35] SAHELI M, SEPANTAFAR M, POURNASR B, et al. Three-dimensional liver-derived extracellular matrix hydrogel promotes liver organoids function [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(6): 4320-

- 33.
- [36] ABACI A, GUVENDIREN M. Designing decellularized extracellular matrix-based bioinks for 3D bioprinting [J]. *Adv Healthc Mater*, 2020, 9(24): e2000734.
- [37] KEANE T J, LONDONO R, TURNER N J, et al. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(6): 1771-81.
- [38] ZHONG S, ZHENG L, WU Y, et al. Rotating culture regulates the formation of HepaRG-derived liver organoids via YAP translocation [J]. *BMC Biol*, 2024, 22(1): 262.
- [39] WENG Y, HAN S, SEKYI M T, et al. Self-assembled matrigel-free iPSC-derived liver organoids demonstrate wide-ranging highly differentiated liver functions [J]. *Stem Cells*, 2023, 41(2): 126-39.
- [40] CHEN J, ZHANG J, YANG L, et al. Facile suspension culture protocol of the liver biliary organoids [J]. *Bio-Des Manuf*, 2022, 6(1): 74-81.
- [41] TAKEBE T, SEKINE K, KIMURA M, et al. Massive and reproducible production of liver buds entirely from human pluripotent stem cells [J]. *Cell Rep*, 2017, 21(10): 2661-70.
- [42] 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): 3606-16.
- [43] SHRESTHA S, LEKKALA V K R, ACHARYA P, et al. Reproducible generation of human liver organoids (HLOs) on a pillar plate platform via microarray 3D bioprinting [J]. *Lab Chip*, 2024, 24(10): 2747-61.
- [44] SUN L, WANG Y, ZHANG S, et al. 3D bioprinted liver tissue and disease models: current advances and future perspectives [J]. *Biomater Adv*, 2023, 152: 213499.
- [45] TALBOT N C, CAPERNA T J. Proteome array identification of bioactive soluble proteins/peptides in Matrigel: relevance to stem cell responses [J]. *Cytotechnology*, 2015, 67(5): 873-83.
- [46] ORKIN R W, GEHRON P, MCGOODWIN E B, et al. A murine tumor producing a matrix of basement membrane [J]. *J Exp Med*, 1977, 145(1): 204-20.
- [47] MA P, CHEN Y, LAI X, et al. The translational application of hydrogel for organoid technology: challenges and future perspectives [J]. *Macromol Biosci*, 2021, 21(10): e2100191.
- [48] RICO-LLANOS G A, BORREGO-GONZÁLEZ S, MONCAYO-DONOSO M, et al. Collagen type I biomaterials as scaffolds for bone tissue engineering [J]. *Polymers*, 2021, 13(4): 599.
- [49] YUAN X, WU J, SUN Z, et al. Preclinical efficacy and safety of encapsulated proliferating human hepatocyte organoids in treating liver failure [J]. *Cell Stem Cell*, 2024, 31(4): 484-98, e5.
- [50] SORRENTINO G, REZAKHANI S, YILDIZ E, et al. Mechano-modulatory synthetic niches for liver organoid derivation [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3416.
- [51] KLOTZ B J, OOSTERHOFF L A, UTOMO L, et al. A versatile biosynthetic hydrogel platform for engineering of tissue analogues [J]. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8(19): e1900979.
- [52] CRAPO P M, GILBERT T W, BADYLAK S F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(12): 3233-43.
- [53] WILLEMSE J, VAN TIENDEREN G, VAN HENGEL E, et al. Hydrogels derived from decellularized liver tissue support the growth and differentiation of cholangiocyte organoids [J]. *Biomaterials*, 2022, 284: 121473.
- [54] VELASCO V, SHARIATI S A, ESFANDYARPOUR R. Microtechnology-based methods for organoid models [J]. *Microsyst Nanoeng*, 2020, 6: 76.
- [55] ROBERTO DE BARROS N, WANG C, MAITY S, et al. Engineered organoids for biomedical applications [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2023, 203: 115142.
- [56] LV D, HU Z, LU L, et al. Three-dimensional cell culture: a powerful tool in tumor research and drug discovery [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6): 6999-7010.
- [57] SONG T, ZHANG H, LUO Z, et al. Primary human pancreatic cancer cells cultivation in microfluidic hydrogel microcapsules for drug evaluation [J]. *Adv Sci*, 2023, 10(12): e2206004.
- [58] BHATIA S N, INGBER D E. Microfluidic organs-on-chips [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(8): 760-72.
- [59] WANG Y, LIU H, ZHANG M, et al. One-step synthesis of composite hydrogel capsules to support liver organoid generation from hiPSCs [J]. *Biomater Sci*, 2020, 8(19): 5476-88.
- [60] BOUWMEESTER M C, BERNAL P N, OOSTERHOFF L A, et al. Bioprinting of human liver-derived epithelial organoids for toxicity studies [J]. *Macromol Biosci*, 2021, 21(12): e2100327.
- [61] REN Y, YANG X, MA Z, et al. Developments and opportunities for 3D bioprinted organoids [J]. *Int J Bioprint*, 2021, 7(3): 364.
- [62] MAHARJAN S, MA C, SINGH B, et al. Advanced 3D imaging and organoid bioprinting for biomedical research and therapeutic applications [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2024, 208: 115237.
- [63] YIN F, ZHANG X, WANG L, et al. HiPSC-derived multi-organoids-on-chip system for safety assessment of antidepressant drugs [J]. *Lab Chip*, 2021, 21(3): 571-81.
- [64] SKARDAL A, ALEMAN J, FORSYTHE S, et al. Drug compound screening in single and integrated multi-organoid body-on-a-chip systems [J]. *Biofabrication*, 2020, 12(2): 025017.
- [65] JANANI G, PRIYA S, DEY S, et al. Mimicking native liver lobule microarchitecture *in vitro* with parenchymal and non-parenchymal cells using 3D bioprinting for drug toxicity and drug screening applications [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14(8): 10167-86.
- [66] AL HROUT A, CERVANTES-GRACIA K, CHAHWAN R, et al. Modelling liver cancer microenvironment using a novel 3D culture system [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 8003.
- [67] MANNAERTS I, EYSACKERS N, ANNE VAN OS E, et al. The fibrotic response of primary liver spheroids recapitulates *in vivo* hepatic stellate cell activation [J]. *Biomaterials*, 2020, 261: 120335.
- [68] MA Y, HU L, TANG J, et al. Three-dimensional cell co-culture liver models and their applications in pharmaceutical research [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7): 6248.
- [69] WANG D, LI Y, ZHANG Y, et al. High throughput screening (HTS) in identification new ligands and drugable targets of G protein-coupled receptors (GPCRs) [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2012, 15(3): 232-41.
- [70] ZHAI J, LI C, LI H, et al. Cancer drug screening with an on-chip multi-drug dispenser in digital microfluidics [J]. *Lab Chip*, 2021, 21(24): 4749-59.
- [71] SHINOZAWA T, KIMURA M, CAI Y, et al. High-fidelity drug-induced liver injury screen using human pluripotent stem cell-derived organoids [J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(3): 831-46.

- e10.
- [72] WU N P, WANG W, GADIAGELLAN D, et al. An automated robotic interface for assays: facilitating machine learning in drug discovery by the automation of physicochemical property assays [J]. *ACS Omega*, 2024, 9(23): 24948-58.
 - [73] MATTIAZZI USAJ M, STYLES E B, VERSTER A J, et al. High-content screening for quantitative cell biology [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(8): 598-611.
 - [74] ZHANG C J, MEYER S R, O'MEARA M J, et al. A human liver organoid screening platform for DILI risk prediction [J]. *J Hepatol*, 2023, 78(5): 998-1006.
 - [75] TAN S, DING Y, WANG W, et al. Development of an AI model for DILI-level prediction using liver organoid brightfield images [J]. *Commun Biol*, 2025, 8(1): 886.
 - [76] LALONE V, AIZENSHTADT A, GOERTZ J, et al. Quantitative chemometric phenotyping of three-dimensional liver organoids by Raman spectral imaging [J]. *Cell Rep Methods*, 2023, 3(4): 100440.
 - [77] BAI L, WU Y, LI G, et al. AI-enabled organoids: construction, analysis, and application [J]. *Bioact Mater*, 2024, 31: 525-48.
 - [78] MIRAHMAD M, SABOURIAN R, MAHDAVI M, et al. *In vitro* cell-based models of drug-induced hepatotoxicity screening: progress and limitation [J]. *Drug Metab Rev*, 2022, 54(2): 161-93.
 - [79] MA Y, HE R, DENG B, et al. Advanced 3D bioprinted liver models with human-induced hepatocytes for personalized toxicity screening [J]. *J Tissue Eng*, 2025, 16: 20417314241313341.
 - [80] NOH H, CHOI S, PARK K W, et al. Amino acid hepatotoxicity biomarkers in human hepatic organoids: promising standardization of drug toxicity evaluation [J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2025, 8(2): 510-21.
 - [81] WANG X, SU Y, CHEN X, et al. Bavachinin causes cholestasis by down-regulating BAAT expression and disrupting glycocholic acid synthesis in human liver organoids [J]. *Food Chem Toxicol*, 2025, 201: 115438.
 - [82] ULENBERG S, BĄCZEK T. Metabolic stability studies of lead compounds supported by separation techniques and chemometrics analysis [J]. *J Sep Sci*, 2021, 44(1): 373-86.
 - [83] LEUNG C, LIU J, CUNICO K, et al. An integrated hepatocyte stability assay for simultaneous metabolic stability assessment and metabolite profiling [J]. *Drug Metab Dispos*, 2024, 52(5): 377-89.
 - [84] MOSTAFA G A E, KADI A A, ALMASOUD N, et al. LC-MS/MS method for the quantification of the anti-cancer agent infiratinib: application for estimation of metabolic stability in human liver microsomes [J]. *J Chromatogr B*, 2021, 1179: 122806.
 - [85] QIAN T, FUJIWARA N, KONERU B, et al. Molecular signature predictive of long-term liver fibrosis progression to inform anti-fibrotic drug development [J]. *Gastroenterology*, 2022, 162(4): 1210-25.
 - [86] GUAN Y, ENEJDER A, WANG M, et al. A human multi-lineage hepatic organoid model for liver fibrosis [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6138.
 - [87] FOIL K E. Variants of SERPINA1 and the increasing complexity of testing for alpha-1 antitrypsin deficiency [J]. *Ther Adv Chronic Dis*, 2021, 12_suppl: 20406223211015954.
 - [88] PÉREZ-LUZ S, LALCHANDANI J, MATAMALA N, et al. Quantitative lipid profiling reveals major differences between liver organoids with normal Pi*M and deficient Pi*Z variants of alpha-1-antitrypsin [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(15): 12472.
 - [89] GÓMEZ-MARIANO G, MATAMALA N, MARTÍNEZ S, et al. Liver organoids reproduce alpha-1 antitrypsin deficiency-related liver disease [J]. *Hepatol Int*, 2020, 14(1): 127-37.
 - [90] 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: 114-23.
 - [91] YANG H, CHENG J, ZHUANG H, et al. Pharmacogenomic profiling of intra-tumor heterogeneity using a large organoid biobank of liver cancer [J]. *Cancer Cell*, 2024, 42(4): 535-51.e8.
 - [92] 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.
 - [93] MENG W, XU X, XIAO Z, et al. Cancer drug sensitivity prediction based on deep transfer learning [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(6): 2468.
 - [94] AHN S J, LEE S, KWON D, et al. Essential guidelines for manufacturing and application of organoids [J]. *Int J Stem Cells*, 2024, 17(2): 102-12.
 - [95] 国家科技伦理委员会人工智能、生命科学伦理分委员会.《虚拟现实技术研发伦理指引》和《人类类器官研究伦理指引》发布[Z]. 中华人民共和国科学技术部. 2025, 4.
 - [96] PRASAD R, GHOSH A, PATEL V, et al. Voices of nanomedicine: blueprint guidelines for collaboration in addressing global unmet medical needs [J]. *ACS Nano*, 2025, 19(3): 2979-91.
 - [97] CHANG R, EMAMI K, WU H, et al. Biofabrication of a three-dimensional liver micro-organ as an *in vitro* drug metabolism model [J]. *Biofabrication*, 2010, 2(4): 045004.
 - [98] REZAEI Z, WANG N, YANG Y, et al. Enhancing organoid technology with carbon-based nanomaterial biosensors: advancements, challenges, and future directions [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2025, 222: 115592.
 - [99] MAN Y, LIU Y, CHEN Q, et al. Organoids-on-a-chip for personalized precision medicine [J]. *Adv Healthc Mater*, 2024, 13(30): e2401843.