

【综述】

用于药物毒理学评价的器官芯片认证和验证研究进展

俞月^{1,2}, 周晓冰^{2*}, 耿兴超^{2*}, 李波^{1,2}

1. 中国医学科学院北京协和医学院, 北京 100005

2. 中国食品药品检定研究院 国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176

摘要: 随着科学技术的发展, 肝脏、肾脏、肺、心脏等单器官芯片模型及多器官芯片模型不断出现, 但如何准确评价器官芯片的性能, 推动其向药物研发及注册监管的应用仍是当前面临的挑战。为了能够更好地了解器官芯片在药物毒理学研究中应用的法规要求, 总结了国际上主要药品监管机构开展的器官芯片认证和验证工作的现状, 通过解读国际专家共识并结合目前研究进展, 就器官芯片的监管工作提出了几点建议, 以期后续器官芯片在药物安全性评价研究中的应用提供参考。

关键词: 器官芯片; 药物毒理学; 体外新模型; 药品监管; 药物安全性评价

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2023) 01-0180-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.01.024

Research progress on qualification and validation of organ-on-chip(s) for drug toxicology evaluation

YU Yue^{1,2}, ZHOU Xiaobing^{2*}, GENG Xingchao², LI Bo^{1,2}

1. Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

2. Beijing Key Laboratory of Drug Non-clinical Safety Evaluation, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China

Abstract: Organ-on-chip(s) models of the liver, kidney, lung, heart and multiple organs have been developed as a result of the scientific technology revolution. To accelerate their application in drug development and medicine registration regulation, especially in toxicological research, guidance is needed in determining how to evaluate their performances precisely. To serve as a reference for subsequent drug safety evaluation, in this article, we first discussed the qualification and validation work of organ-on-chip(s) carried out by several major regulatory agencies in various countries. Then, several reasonable recommendations for organ-on-chip(s) validation by interpreting the expert consensus and the latest research progress were discussed.

Key words: organ-on-chip(s); drug toxicology; *in vitro* novel model; drug regulation; drug safety evaluation

器官芯片又名微流控、微生理系统, 通过在芯片上构建复杂的生理系统, 体外再现人体组织和器官的结构和功能, 模拟人体的化学梯度和生物力, 以实现对组织形态、生理功能和代谢产物的实时监测^[1]。随着相关研究逐步深入, 器官芯片技术有望在药物筛选、病理研究、临床诊断和环境毒性监测等诸多领域发挥重要作用。

药物毒性是药物筛选的重要内容, 同时也是导致众多药物研发失败及药品撤市的原因, 这说明目前的药物毒性评价方法具有一定的局限性。在早期药物发现阶段, 药物毒性评价以动物实验为主, 但动物模型难以准确反映临床患者的实际情况, 无法克服种属差异性。这些局限性会造成毒性预测结果不完全准确^[2-4], 所以研究者不断寻找能够更加

收稿日期: 2022-10-12

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(2018ZX09201017-001, 2018ZX09101002-002-002)

第一作者: 俞月, 博士, 研究方向为药物安全性评价。E-mail: y1935222y@qq.com

*共同通信作者: 周晓冰, 女, 研究员, 研究方向为药物安全性评价。E-mail: zhxb@nifdc.org.cn

耿兴超, 男, 研究员, 研究方向为药物安全性评价。E-mail: gengxch@nifdc.org.cn

准确评价药物毒性的替代方法。2004年,美国康奈尔大学的Michael团队首次发明了器官芯片^[5]。迄今,该领域每年的文章数量呈爆发式增长,学术界构建了可用于毒理评价的肝脏^[6]、肾脏^[7]、肺^[8]、心脏^[9]等单器官芯片模型及多器官芯片模型^[10]。因为器官芯片不但具有比二维(2D)细胞模型更完整的结构和功能,还能够解决动物与人类之间的种属差异,有效模拟人体生理状态^[11],所以器官芯片能克服部分动物模型的局限性,是极具应用前景的替代模型。一旦器官芯片试验的有效性和安全性被充分验证,将有助于替代药物开发中的动物试验^[12],减少动物的使用,并为因种属差异而缺乏合适评价模型的药物研发提供新的工具。

1 为推进器官芯片用于药物毒理学评价已进行的主要工作

尽管学术界对器官芯片技术给予厚望,但是2020年发表于《ALTEX》杂志上的行业专家共识指出,目前这一技术不但没有广泛应用于制药行业,而且也未见于新药审评^[13]。为推进器官芯片在药物毒理学研究中的应用,一方面,研究者需要说明模型的使用条件(CoU),CoU需要详细说明模型适用范围、使用方法和模型的检测范围。研究者还需要向监管机构和提供方提供芯片模型的各项测试结果和数据,说明该模型适用于特定CoU^[13-14]。另一方面,在新技术被正式采纳并推广前,应证明技术的可靠性及科学性^[14],即需要对模型进行充分的验证。验证是对模型测试系统的科学基础和再现性,以及相关预测模型的预测能力进行独立评估的过程,旨在通过测试重现性和相关性来提供支持体外测试方法的数据,从而确定方法能否在满足CoU的条件下应用,测试内容包括精密度、检测限、准确度、特异性、灵敏度和稳定性等^[13]。当模型经过充分的验证后便可使用,即使没有获得监管部门的使用认证。认证是在满足CoU的条件下,模型的结果可有效地解释或应用于产品开发和监管决策的结论。参考美国食品药品监督管理局(FDA)发布的预测毒理学路线图,FDA正在尝试对部分新的生物和毒理学模型进行评估和认证,一旦通过认证,不但从业者可在满足CoU的条件下应用该方法,而且监管机构不需要再重新审查支持信息^[15]。

器官芯片等体外模型的验证和认证工作需要各国学术界、器官芯片硬件供应商、芯片使用方和监管机构的共同努力。根据美国国立卫生研究院(NIH)发布的文件^[16-17],NIH与FDA于2010年发

起合作,以推进科学监管。2012年,美国国立促进转化科学中心(NCATS)推出组织芯片药物筛选计划;2016年,NCATS成立了组织芯片测试中心(TCTCs),资助德克萨斯农工大学器官芯片验证中心、麻省理工大学器官芯片技术转化中心和匹兹堡大学微流控系统数据库中心进行器官芯片技术的可用性、独立测试和验证研究工作,该项目不仅完成了部分器官芯片模型的重现工作,还建立了存储器官芯片测试结果的数据库^[16-17]。2017年,FDA为确保在毒理学领域与时俱进,采用前沿科学评估其监管产品的安全性和有效性,制定了预测毒理学路线图,提出了新方法需要解决的毒理学问题、毒理学领域需要提高预测性的问题以及未来FDA将要开展的毒理学工作,试图将预测性毒理学方法纳入安全性和风险评估工作(表1)。同时FDA与多家芯片供应商达成合作共识,将器官芯片技术引入实验室,以期实现对该技术的监管^[15]。2021年,FDA评估了三维(3D)器官芯片的重现性,其评估工作由肝脏和心脏器官芯片逐渐发展至其他器官芯片模型,该项目重点关注了器官芯片技术在药物安全指标、药物-药物相互作用和药效领域的应用,试图获得相关数据制定器官芯片行业质量控制和性能标准^[18]。

对于替代模型的监管,早在2010年发布的2010/63/EU文件中,欧洲药品管理局(EMA)要求在药物监管测试过程中尽可能满足3R原则(reduction, refinement and replacement),提出了3R检测方法监管标准^[19](表2)。2017年,EMA举办了第一届EMA研讨会,旨在促进各领域的合作。该研讨会探讨了微流控系统面临的挑战与机遇,提出监管机构应参与建立器官芯片验证的标准,并建议器官芯片模型的验证工作应结合临床工作^[20]。2021年9月,EMA建议在药物开发过程中尽量减少动物试验,鼓励使用器官芯片等替代方法,为此成立了EMA创新工作组,以促进替代方法的开发与评估^[21]。

随着越来越多器官芯片模型建立,监管机构应当逐步开展器官芯片验证和认证工作,让使用方能够逐步接受及科学使用这一技术。通过理解专家共识并结合现有研究进展,就器官芯片模型的验证工作提出以下建议:(1)采用适当检测方法检测芯片的结构特征和生理功能;(2)器官芯片应具有重现性、稳定性,器官芯片相关技术应可复制,并不断改进;(3)应采用系列化合物对器官芯片模型进行

表1 美国FDA预测毒理学路线图工作内容

Table 1 FDA predictive toxicology roadmap

待解决的问题	工作内容
新方法需要解决的毒理学问题	更好地预测人类、动物和环境对FDA监管任务相关的各种物质的反应
需要提高预测性的问题	(1)确定未观察到不良反应的剂量或全身暴露水平 (2)潜在毒性靶器官、潜在生殖发育毒性和潜在致癌性 (3)安全合理的药物首次剂量 (4)食品中的潜在风险(包括食品添加剂、兽药残留及污染物) (5)植入的医疗设备可能产生的局部组织反应等
FDA将要开展的毒理学工作	(1)促进FDA毒性测试相关部门与研究人员沟通,将新方法和新技术推广于安全性监管和风险评估工作 (2)进行新方法的培训工作 (3)建立跨学科和跨部门的国内/国际合作关系以建立新方法 (4)研究诸如物种间及不同人群间生物标志物表征差异等检测指标差异 (5)确保FDA机构内部及相关国内、外机构间持续的沟通和合作

表2 EMA 3R检测方法监管标准

Table 2 Guideline on principles of regulatory acceptance of EMA 3R

监管内容	监管标准
可行性	测试方法详实可行,有科学可靠的检测终点,方法的标准操作规程应足够详细
相关性和准确性	对于特定CoU,检测方法应正确的测定或预测目标生物效应的强度或变化
CoU和局限性	CoU应包括3Rs检测方法的适用范围和局限性;CoU应提供相关数据,说明新的或替代的测试方法填补了检测领域的空白,或新方法获得的数据至少与使用现有方法获得的数据同样有效或者更好
稳定性和重现性	相同的测试方法可以复现

相关验证;(4)应进行毒性早期发现阶段的生物标志物识别及验证工作^[12]。下文结合器官芯片研究具体实例进行简要介绍。

2 基于结构特征和生理功能的器官芯片功能验证

2.1 结构特征

器官芯片模型应具有人体行使正常功能的结构特征^[22]。例如,采用显微技术,Karalis等^[23]观察模型单层扁平鳞状细胞及稀疏微绒毛分布的肠道结构。Svendsen等^[24]参考血脑屏障结构,按照3:1的比例将星状细胞和周细胞接种于一侧,形成代表脑部结构的腔室,并于另一侧接种人诱导多能干细胞(hiPSC)来源的脑微血管内皮样细胞,形成血液侧,用免疫荧光技术检测了单层屏障的形成。

2.2 生理功能

器官芯片模型应具有满足CoU的生理功能。例如,当检测药物肝脏毒性时,肝脏模型应当具有正常的代谢及排泄功能^[6]。具有膜结构的组织,如肠屏障和血脑屏障,当检测药物对屏障功能的损伤时,这些膜结构应该具有正常的转运、分泌和屏障功能^[25-26]。研究者可使用化合物判断模型的生理功能,例如,吲哚花青绿^[6]可用于肝脏排泄能力的检

测,荧光标记葡聚糖^[27]和荧光黄^[25]可判断屏障的渗透性。

部分研究在模型中重现了化合物的代谢产物及代谢途径,以验证模型代谢功能的有效性。在肝-肾器官芯片中,Chang等^[28]通过复现马兜铃酸造成的肝肾毒性及其代谢产物,可以初步验证模型与人体的一致性。Bavli等^[29]通过对肝脏芯片模型进行连续的氧化磷酸化至厌氧糖酵解过程的实时分析,动态监测肝脏细胞线粒体损伤。在肝脏芯片中,肝细胞代谢功能丧失的早期会发生吸收、分布、代谢、排泄(ADME)基因转录的减少^[30],因此监测ADME相关基因的变化很重要。一些研究还关注了与毒性代谢相关的通路,例如通过检测肝脏对刺激反应的代谢指纹,监测碳代谢相关代谢通量的动态变化^[31]。

单器官芯片模型模拟单个器官的最小的功能单位,而多器官芯片模拟人体实际情况并反映人体交互的本质,增加了器官之间的相互作用并促进了一种更接近生理的药物递送和摄取方法^[22]。在多器官芯片中,参考人体各器官间的交互作用,部分研究将各种组织的交互作用也作为验证指标。在

含肝脏、心脏、肺、内皮、脑和睾丸的多器官芯片模型中,通过在肝脏类器官中代谢烷基化前体药物异环磷酰胺产生氯乙醛并诱导下游神经毒性,可验证芯片中多组织的相互作用^[32]。在子宫内膜-卵巢的双生殖器官中,研究评估了模型双向内分泌的干扰^[33]。

3 器官芯片重现性和稳定性验证

3.1 重现性

FDA于2017年制定的预测毒理学路线图中认为政府机构应该需要评估模型的重现性。因此,FDA药品审评和研究中心(CDER)已经开始评估器官芯片能否产生符合质量控制标准和功能标准的可重复的结果,截至2021年8月,其评价范围集中在肝脏和心脏器官芯片领域^[16]。

3.2 稳定性

在测试时间段内,器官芯片应在循环系统中维持稳定的生理功能。例如,为建立能维持21 d的多器官芯片模型,Rajan等^[32]检测了21 d后类器官能否维持活力,以证明该多器官芯片系统可以长期使用。

4 基于化合物的模型验证工作

在毒性反应发生时,器官的生理状态会迅速向病理状态转变,使用化合物诱导可以验证模型并模拟这一过程。例如,为模拟药物诱导性的肺水肿,Huh等^[34]考察了肺芯片模型屏障功能完整性和运输

功能在白细胞介素-2诱导下的变化。由于部分药物会引起肝脏脂肪蓄积和纤维化,为模拟这种病理状态,Nawroth等^[35]考察了肝芯片模型能否脂肪变性和纤维化,并对其敏感性和代谢参数变化进行了检测。该团队还建立了可判断生殖毒性的肝脏-睾丸模型,再现了环磷酰胺的生殖毒性^[36]。Achberger等^[37]通过复制氯喹和庆大霉素的视网膜副作用,证明了视网膜芯片模型在药物毒性评价中的适用性。甲基苯丙胺可引起血脑屏障的可逆破坏,Parker等^[26]通过给予甲基苯丙胺,判断血脑屏障功能及模型被药物破坏后续的恢复功能。

采用系列化合物测定模型结构特征和生理功能的变化是一种常见的模型验证方式。使用阳性药诱导正常器官芯片模型,通过观测模型变化与药物毒理作用及诱导的预期病理状态的一致性,说明模型可诱导为预期的毒理状态。除了常用的阳性药外,验证还需要设置假阳性药^[38]和阴性药^[39],进一步验证模型结果的可靠性。表3列举了部分可用于诱导器官芯片模型产生病理损伤的阳性药及毒性作用。

5 毒性早期发现阶段生物标志物的识别与验证

生物标志物是一种能够客观测量并评价正常生物过程、病理过程或对药物干预反应的指示物^[46],可用于状态监测、疾病诊断和安全性评价。反映细胞功能的人体内生物标志物可用于评估器

表3 器官芯片毒理学研究常用阳性药及毒性作用

Table 3 Information of compounds used in organ-on-chips' toxicology research

中文名	英文名	芯片类型	毒性作用
阿霉素 ^[7]	doxorubicin	肾脏	肾小球损伤
多黏菌素 ^[40]	polymyxin	肾脏	急性肾损伤
替诺福韦 ^[41]	tenofovir	肾脏	肾功能损伤
对乙酰氨基酚 ^[6]	acetaminophen	肝脏	急性肝衰竭
波生坦 ^[42]	bosentan	肝脏	肝毒性,诱导胆汁淤积
甲氨蝶呤 ^[42]	methotrexate	肝脏	造成脂肪变性、星状细胞肥大和纤维化等肝损伤
非阿尿苷 ^[42]	fialuridine	肝脏	部分人群中诱导肝脂肪变性
尼美舒利 ^[43]	nimesulide	肝脏	肝功能衰竭
双氯芬酸 ^[44]	diclofenac	肝脏	代谢物诱导肝毒性
黄曲霉毒素B1 ^[45]	aflatoxin B1	肝脏	急性肝毒性,肝致癌物
丙戊酸钠 ^[31]	depakine	肝脏	代谢诱导的线粒体功能障碍
维拉帕米 ^[6]	verapamil	心脏	不良反应,抑制I型通道和钙离子释放
异丙肾上腺素 ^[38]	isoproterenol	心脏	不良反应, β -肾上腺素能激动剂
特非那定 ^[38]	terfenadine	心脏	本身阻滞钾离子通道,诱导心率失常
尼卡地平 ^[9]	nicardipine	心脏	不良反应,钙离子拮抗剂
阿司匹林 ^[27]	acetylsalicylic acid	肠道	影响肠屏障紧密连接功能

官芯片模型与人体的相似度。

以肝脏器官芯片模型为例,转铁蛋白、白蛋白^[47]、尿素^[30]和细胞色素P450(CYP)酶^[42]等均可作为肝脏特异性的生物标志物,反映肝脏的健康状态。转铁蛋白在维持肝脏正常功能和预防铁死亡诱导的纤维化方面发挥作用^[48]。尿素可以表征具有代谢活力的肝细胞线粒体活性^[30]。而白蛋白在肝脏产生,当肝合成功能异常时,白蛋白的合成会减少。通过在线分析细胞转铁蛋白和白蛋白的变化,可以判断药物是否诱导肝脏模型损伤^[47],而CYP酶作为肝脏代谢能力的重要生物标志物,其变化能反映部分内源性化合物合成和降解的能力及药物对肝脏代谢能力的影响^[6, 42]。

在肠芯片模型建立过程中,为说明肠芯片发生极化,研究者可以对绒毛蛋白和E-钙黏蛋白这两种细胞表面标志物进行观察^[23]。为了充分模拟肠道屏障结构,紧密连接蛋白(ZO-1)和闭合蛋白2这两种生物标志物常用于反映肠道屏障的紧密连接程度^[27]。

在多能干细胞诱导建立的芯片模型中,生物标志物常用于验证细胞的分化状态,说明细胞分化并具有成熟功能。为建立具有肾小管屏障功能的肾芯片模型,Musah等^[7]首先对hiPSC诱导得到的足细胞标志物POU域5类转录因子1(POU5F1)和配对盒蛋白(PAX2)等基因的表达进行了分析,验证hiPSC分化为足细胞。在诱导hiPSC细胞分化建立的肝脏或心脏器官芯片模型中,Giobbe等^[6]以细胞的多能性标志物八聚体结合转录因子(OCT4)、同源盒转录因子(NANOG)和各胚层分化标志物微管蛋白(TUBB3)和甲胎蛋白2等基因作为检测指标,以验证细胞分化状态。

器官芯片模型可以使用部分毒性生物标志物验证毒性终点。 α -Syn经 α -Syn fibrils诱导磷酸化,可产生脑毒性,模型对响应神经毒性的蛋白质 α -Syn蛋白进行监测,可验证神经毒性^[25]。通过观察肝脏芯片模型乳酸脱氢酶的分泌情况,可以监测早期的肝毒性作用^[35]。Park等^[33]使用人类子宫内膜和卵巢的细胞成分,开发了“芯片上的双生殖器官”,发现了生殖毒性标志物纤溶酶原激活物抑制剂2(SERPINB2),并建立了SERPINB2的荧光素酶报告系统,用于预测生殖毒性。在血管芯片模型中,为评价药物是否诱导单核细胞黏附于内皮微血管,Poussin等^[49]测定了炎症和氧化应激蛋白标志物。在肝脏-肿瘤-胃多器官芯片模型中,Skardal

等^[50]同时检测了白蛋白、急性肝损伤生物标志物谷胱甘肽S-转移酶 α (GST- α)和心肌损伤生物标志物肌酸激酶的水平,在模拟药物代谢的同时检测了药物肝脏和心脏的毒性。为了连续监测肝脏芯片分泌生物标记物白蛋白和GST的水平,Khademhosseini等^[51]优化检测器,实现了对模型高灵敏度、高特异性及高通量的实时监控,不仅检测水平达到了纳摩尔级,还可对代谢的变化进行长达7 d的监测。

6 结语与展望

在生物工程学、材料学、细胞生物学等多学科内容影响下,基于干细胞、类器官等多种培养技术建立了多种复杂的器官芯片模型。这些模型可针对性地对药物毒性进行测定,解决药物毒理学研究的种属差异。此外,器官芯片可进行高通量的筛选,也可以与其他器官芯片进行联用,用于化合物多器官毒性的快速筛选,这是动物实验所达不到的。但是目前器官芯片多是对一个或数个器官进行模拟,未能形成“人体芯片”的规模,与动物实验相比器官芯片仅能够对有限的内容进行检测。而且当前器官芯片缺乏统一的技术标准及指导原则^[13],也鲜有研究对不同的毒理模型进行对比,需要进行验证和认证工作评判不同模型。

本文简要介绍了各国监管机构进行的器官芯片的认证和验证工作,并就器官芯片的验证工作提出了相关建议,以期后续器官芯片在药物安全性评价中的应用提供参考,但进行验证工作需要进行考察的内容不仅限于此。本论文未提及的工作内容还包括:硬件供应商提供的仪器和芯片需要经过3Q认证,模型开发者和使用方需要保证细胞来源、细胞的培养条件^[13],等。

对于监管机构而言,在新兴领域飞速发展的今天,器官芯片等替代模型的出现为政府的监管带来前所未有的挑战。虽然多数器官芯片研究仍处于模型开发阶段,但是芯片研究发展态势仍旧迅猛。根据目前的发展情况,器官芯片的验证工作还需要监管机构、硬件供应商、模型开发者和使用方等多方面的沟通协调。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Low L A, Mummery C, Berridge B R, et al. Organs-on-chips: Into the next decade [J]. Nat Rev Drug Discov, 2021, 20(5): 345-361.

- [2] Perel P, Roberts I, Sena E, et al. Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review [J]. *BMJ*, 2007, 334(7586): 197.
- [3] Cook N, Jodrell D I, Tuveson D A. Predictive *in vivo* animal models and translation to clinical trials [J]. *Drug Discov Today*, 2012, 17(5): 253-260.
- [4] Cavagnaro J, Silva Lima B. Regulatory acceptance of animal models of disease to support clinical trials of medicines and advanced therapy medicinal products [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 759: 51-62.
- [5] Viravaidya K, Sin A, Shuler M L. Development of a microscale cell culture analog to probe naphthalene toxicity [J]. *Biotechnol Progr*, 2004, 20(1): 316-323.
- [6] Giobbe G G, Michielin F, Luni C, et al. Functional differentiation of human pluripotent stem cells on a chip [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(7): 637-640.
- [7] Musah S, Mammoto A, Ferrante T C, et al. Mature induced-pluripotent-stem-cell-derived human podocytes reconstitute kidney glomerular-capillary-wall function on a chip [J]. *Nat Biomed Eng*, 2017, 1(5): 69.
- [8] Huh D, Matthews B D, Mammoto A, et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip [J]. *Science*, 2010, 328(5986): 1662-1668.
- [9] Lind J U, Yadid M, Perkins I, et al. Cardiac microphysiological devices with flexible thin-film sensors for higher-throughput drug screening [J]. *Lab Chip*, 2017, 17(21): 3692-3703.
- [10] McAleer C W, Long C J, Elbrecht D, et al. Multi-organ system for the evaluation of efficacy and off-target toxicity of anticancer therapeutics [J]. *Sci Trans Med*, 2019, 11(497): v1386.
- [11] Vulto P, Joore J. Adoption of organ-on-chip platforms by the pharmaceutical industry [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(12): 961-962.
- [12] Marx U. Biology-inspired microphysiological systems to advance medicines for patient benefit and animal welfare [J]. *ALTEX*, 2020, 37(3): 365-394.
- [13] Marx U, Akabane T, Andersson T B, et al. Biology-inspired microphysiological systems to advance patient benefit and animal welfare in drug development [J]. *ALTEX*, 2020, 37(3): 365-394.
- [14] McDuffie J E, Olaharski A J, Jeffy B D, et al. *Drug Discovery Toxicology: From Target Assessment to Translational Biomarkers* [M]. Hoboken: John Wiley & Sons, Incorporated, 2016.
- [15] FDA. FDA Launches Predictive Toxicology Roadmap [EB/OL]. (2020-09-25) [2022-05-30]. <https://www.fda.gov/science-research/about-science-research-fda/fdas-predictive-toxicology-roadmap>.
- [16] NCATS. Tissue Chip Program Collaborations and Partnerships [EB/OL]. (2021-05-10)[2022-05-30]. <https://ncats.nih.gov/tissuechip/partnerships#:~:text=The%20Tissue%20Chip%20for%20Drug%20Screening%20program%20began,and%20the%20U.S.%20Food%20and%20Drug%20Administration%20%28FDA%29>.
- [17] NCATS. About Tissue Chip [EB/OL]. (2021-02-18) [2022-07-12]. <https://ncats.nih.gov/tissuechip/about>.
- [18] FDA. Three-Dimensional (3D) Cell Culture (Microphysiological) Platforms as Drug Development Tools [EB/OL]. (2021-08-23) [2022-06-25]. <https://www.fda.gov/drugs/regulatory-science-action/three-dimensional-3d-cell-culture-microphysiological-platforms-drug-development-tools>.
- [19] NACATS. Guideline on the principles of regulatory acceptance of 3Rs (replacement, reduction, refinement) testing approaches [EB/OL]. (2021-05-10) [2022-05-30]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-principles-regulatory-acceptance-3rs-replacement-reduction-refinement-testing-approaches_en.pdf.
- [20] EMA. Meeting Report: First EMA workshop on non-animal approaches in support of medicinal product development — challenges and opportunities for use of micro-physiological systems (EMA/CHMP/SWP/250438/2018) [EB/OL]. (2018-10-18) [2022-5-30]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/report-first-ema-workshop-non-animal-approaches-support-medicinal-product-development-challenges_en.pdf.
- [21] EMA. EMA implements new measures to minimise animal testing during medicines development Share [EB/OL]. (2021-09-29)[2022-05-30]. <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-implements-new-measures-minimise-animal-testing-during-medicines-development>.
- [22] 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.
- [23] Kasendra M, Luc R, Yin J, et al. Duodenum intestine-chip for preclinical drug assessment in a human relevant model [J]. *eLife*, 2020, 9: e50135.
- [24] Vatine G D, Barrille R, Workman M J, et al. Human iPSC-derived blood-brain barrier chips enable disease modeling and personalized medicine applications [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(6): 995-1005.
- [25] Peditakis I, Kodella K R, Manatakis D V, et al. Modeling alpha-synuclein pathology in a human brain-chip to assess blood-brain barrier disruption [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5907.
- [26] Maoz B M, Herland A, FitzGerald E A, et al. A linked organ-on-chip model of the human neurovascular unit reveals the metabolic coupling of endothelial and neuronal cells [J]. *Nat Commun*, 2018, 36(9): 865-874.
- [27] Trietsch S J, Naumovska E, Kurek D, et al. Membrane-free culture and real-time barrier integrity assessment of

- perfused intestinal epithelium tubes [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 262.
- [28] Chang S, Weber E J, Sidorenko V S, et al. Human liver-kidney model elucidates the mechanisms of aristolochic acid nephrotoxicity [J]. *JCI Insight*, 2017, 2(22): e95978.
- [29] Bavli D, Prill S, Ezra E, et al. Real-time monitoring of metabolic function in liver-on-chip microdevices tracks the dynamics of mitochondrial dysfunction [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2016, 113(16): E2231-E2240.
- [30] 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 Chip*, 2020, 20(2): 215-225.
- [31] Ehrlich A, Tsytkin-Kirschenzweig S, Ioannidis K, et al. Microphysiological flux balance platform unravels the dynamics of drug induced steatosis [J]. *Lab Chip*, 2018, 18(17): 2510-2522.
- [32] Rajan S A P, Aleman J, Wan M, et al. Probing prodrug metabolism and reciprocal toxicity with an integrated and humanized multi-tissue organ-on-a-chip platform [J]. *Acta Biomater*, 2020, 106: 124-135.
- [33] Park S, Kim S, Lee J W, et al. Development of a novel dual reproductive organ on a chip: Recapitulating bidirectional endocrine crosstalk between the uterine endometrium and the ovary [J]. *Biofabrication*, 2020, 13(1): 15001.
- [34] Huh D, Leslie D C, Matthews B D, et al. A human disease model of drug toxicity — induced pulmonary edema in a lung-on-a-chip microdevice [J]. *Sci Trans Med*, 2012, 4(159): 147r-159r.
- [35] Nawroth J C, Petropolis D B, Manatakis D V, et al. Modeling alcohol-associated liver disease in a human liver-chip [J]. *Cell Rep*, 2021, 36(3): 109393.
- [36] Baert Y, Ruetschle I, Cools W, et al. A multi-organ-chip co-culture of liver and testis equivalents: A first step toward a systemic male reprotoxicity model [J]. *Human Reprod*, 2020, 35(5): 1029-1044.
- [37] Achberger K, Probst C, Haderspeck J, et al. Merging organoid and organ-on-a-chip technology to generate complex multi-layer tissue models in a human retina-on-a-chip platform [J]. *eLife*, 2019, 8: e46188.
- [38] Kujala V J, Pasqualini F S, Goss J A, et al. Laminar ventricular myocardium on a microelectrode array-based chip [J]. *J Mater Chem B*, 2016, 4(20): 3534-3543.
- [39] Cho S, Islas-Robles A, Nicolini A M, et al. In situ, dual-mode monitoring of organ-on-a-chip with smartphone-based fluorescence microscope [J]. *Biosens Bioelectr*, 2016, 86: 697-705.
- [40] Weber E J, Lidberg K A, Wang L, et al. Human kidney on a chip assessment of polymyxin antibiotic nephrotoxicity [J]. *JCI Insight*, 2018, 3(24): e123673.
- [41] Suter-Dick L, Mauch L, Ramp D, et al. Combining extracellular miRNA determination with microfluidic 3D cell cultures for the assessment of nephrotoxicity: A proof of concept study [J]. *AAPS J*, 2018, 20(5): 86.
- [42] Jang K, Otieno M A, Ronxhi J, et al. Reproducing human and cross-species drug toxicities using a liver-chip [J]. *Scie Trans Med*, 2019, 11(517): x5516.
- [43] Verneti L A, Senutovitch N, Boltz R, et al. A human liver microphysiology platform for investigating physiology, drug safety, and disease models [J]. *Exp Biol Med*, 2016, 241(1): 101-114.
- [44] Yu F, Deng R, Hao Tong W, et al. A perfusion incubator liver chip for 3D cell culture with application on chronic hepatotoxicity testing [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 14528.
- [45] Chang S, Voellinger J L, Van Ness K P, et al. Characterization of rat or human hepatocytes cultured in microphysiological systems (MPS) to identify hepatotoxicity [J]. *Toxicol in Vitro*, 2017, 40: 170-183.
- [46] Atkinson A J, Colburn W A, DeGruttola V G, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2001, 69(3): 89-95.
- [47] Riahi R, Shaegh S A M, Ghaderi M, et al. Automated microfluidic platform of bead-based electrochemical immunosensor integrated with bioreactor for continual monitoring of cell secreted biomarkers [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 24598.
- [48] Yu Y, Jiang L, Wang H, et al. Hepatic transferrin plays a role in systemic iron homeostasis and liver ferroptosis [J]. *Blood*, 2020, 136(6): 726-739.
- [49] Poussin C. 3D human microvessel-on-a-chip model for studying monocyte-to-endothelium adhesion under flow — application in systems toxicology [J]. *ALTEX*, 2019, 37(1): 47-63.
- [50] Skardal A, Murphy S V, Devarasetty M, et al. Multi-tissue interactions in an integrated three-tissue organ-on-a-chip platform [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8816-8837.
- [51] Shin S R, Kilic T, Zhang Y S, et al. Label-free and regenerative electrochemical microfluidic biosensors for continual monitoring of cell secretomes [J]. *Adv Sci*, 2017, 4(5): 1600522.

[责任编辑 李红珠]