

小肠类器官来源屏障模型在药物吸收评价中的应用进展

张克霞^{1, 2, 3, 4}, 翟珊^{2, 3}, 张洲^{1, 2}, 翟一凡^{1, 2, 5}, 王丽兴^{1, 2, 3, 4}, 闫文鑫^{1, 2, 3, 4}, 王玲^{1, 2, 3, 4}, 邸志权^{1, 2, 3, 4*}, 胡金芳^{1, 2, 3, 4*}

1. 天津药物研究院有限公司 药物成药性评价与系统转化全国重点实验室, 天津 300301
2. 天津天诚新药评价有限公司, 天津 300462
3. 天津市药代动力学和药效动力学重点实验室, 天津 300462
4. 天津市新药非临床评价技术工程中心, 天津 300462
5. 天津中医药大学, 天津 301617

摘要: 小肠类器官来源 2D 屏障模型作为药物吸收评价的新兴体外工具, 具有人源性和组织来源特征, 可在一定程度上弥补传统 Caco-2 细胞模型在细胞组成、转运体表达和代谢功能方面的局限。该模型可保留部分小肠上皮谱系特征及区域特异性表达模式, 并在适当分化条件下呈现肽转运蛋白 1 (PEPT1)、P-糖蛋白 (P-gp) 等转运体表达和细胞色素 P450 3A4 酶 (CYP3A4) 等代谢酶活性, 可用于药物渗透性评价、转运体功能验证、肠道首过代谢研究及毒性筛选。芯片平台可引入流体剪切力, 多器官芯片可为研究吸收后代谢转化和器官间相互作用提供实验手段。该模型仍面临标准化不足、动物来源基质依赖、部分细胞类型难以长期维持、血管/免疫成分缺乏、微生物互作重建困难及多器官整合有限等挑战。未来, 合成基质、多细胞共培养、微生物共培养、多器官芯片及人工智能辅助分析的发展, 有望提升其在药物吸收、代谢、毒性评价和个体化用药研究中的应用价值。

关键词: 小肠类器官; 2D 屏障模型; 药物吸收评价; 首过代谢; 毒性筛选; 器官芯片

中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)10-3415-18

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.10.005

Recent advances in small intestinal organoid-derived barrier models for drug absorption evaluation

ZHANG Kexia^{1, 2, 3, 4}, ZHAI Shan^{2, 3}, ZHANG Zhou^{1, 2}, ZHAI Yifan^{1, 2, 5}, WANG Lixing^{1, 2, 3, 4}, YAN Wenxin^{1, 2, 3, 4}, WANG Ling^{1, 2, 3, 4}, DI Zhiquan^{1, 2, 3, 4}, HU Jinfang^{1, 2, 3, 4}

1. State Key Laboratory of Druggability Evaluation and Systematic Translational Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Co., Ltd., Tianjin 300301, China
2. Tianjin Tiancheng Drug Assessment Co., Ltd., Tianjin 300462, China
3. Tianjin Key Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Tianjin 300462, China
4. Tianjin Engineering Research Center of Drug Preclinical Assessment Technology, Tianjin 300462, China
5. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Small intestinal organoid-derived 2D barrier models have emerged as promising *in vitro* tools for evaluating drug absorption. Owing to their human origin and tissue-specific characteristics, these models can partially overcome the limitations of conventional Caco-2 cell models in terms of cellular composition, transporter expression, and metabolic function. They retain some epithelial lineage features and region-specific expression patterns of the small intestine and, under appropriate differentiation conditions, exhibit the expression of transporters such as PEPT1 and P-gp, as well as metabolic enzyme activity such as CYP3A4. Therefore, they can be used for drug permeability assessment, transporter function validation, intestinal first-pass metabolism studies, and toxicity screening. Chip-

收稿日期: 2026-05-11

基金项目: 天津市科技计划项目 (24ZYCGSY00640); 天津市科技计划项目 (25YFKFYS00270)

作者简介: 张克霞, 女, 博士, 研究方向为药物吸收与评价。E-mail: zhx09303128@163.com

*通信作者: 胡金芳, 女, 研究员, 研究方向为毒理药理。E-mail: hujf@tipr.com.cn

邸志权, 男, 研究员, 研究方向为毒理药理。E-mail: dizq@tipr.com.cn

based platforms can introduce fluid shear stress, while multi-organ chips provide experimental systems for investigating post-absorptive metabolic transformation and inter-organ interactions. Nevertheless, these models still face challenges, including insufficient standardization, dependence on animal-derived extracellular matrices, difficulty in maintaining certain cell types over the long term, lack of vascular and immune components, limited reconstruction of microbiota interactions, and insufficient multi-organ integration. In the future, the development of synthetic matrices, multicellular co-culture systems, microbiota co-culture technologies, multi-organ chips, and artificial intelligence-assisted analysis is expected to enhance their application value in drug absorption, metabolism, toxicity evaluation, and personalized medication research.

Key words: small intestinal organoids; 2D barrier model; drug absorption evaluation; first-pass metabolism; toxicity screening; organ-on-a-chip

口服给药因其极高的患者依从性、给药便捷性以及较低的生产成本,始终是药物研发的首选给药途径^[1]。然而,药物在口服后能否产生预期的疗效,很大程度上取决于其在人体肠道的转运与吸收效率。人体小肠作为药物吸收的主要场所,其复杂的生理屏障不仅决定了药物的生物利用度,还通过代谢酶和转运体调节药物的药动学特征^[2-3]。因此,在药物研发的早期阶段,对候选化合物进行精确的渗透性与吸收评价至关重要。

长期以来,药物肠道吸收与渗透性评价主要依赖体外细胞模型、离体组织模型和体内动物模型。体外模型以 Caco-2、MDCK-MDR1、TC-7 等的单层细胞为代表,具有操作简便、成本较低和通量较高等优势,适用于药物渗透性初筛;但此类模型多来源于永生化或肿瘤细胞系,细胞组成单一,缺乏正常小肠上皮的区域特异性、黏液层及多细胞谱系结构,转运体和代谢酶表达亦与人体小肠存在差异,可能导致部分药物吸收预测偏差^[4-5]。离体模型如外翻肠囊、离体肠段渗透模型和尤斯灌流室(Ussing chamber)可在一定程度上保留组织结构和屏障功能,但存在组织活性维持时间短、样本来源差异、操作复杂及难以长期动态监测等局限性^[6-7]。体内动物模型能够反映较完整的生理环境,但人与实验动物在肠道 pH 值、转运体/代谢酶活性、肠道菌群组成和药物处置过程等方面存在种属差异,同时还面临成本高、周期长、通量低和伦理限制等问题^[8-9]。

现有传统模型均存在生理仿真性不足、预测准确性有限等问题,无法充分模拟人体肠道屏障的结构与功能,因此开发更具人类生理相关性、可精准模拟肠道微环境的新型体外模型(类器官肠屏障模型、肠道芯片模型等),已成为药物肠道吸收与渗透性评价领域的迫切需求。

1 小肠类器官

近年来,类器官技术快速发展,类器官模型能

够在体外自组装形成三维结构,保留来源组织的细胞异质性、遗传特征及部分生理功能。基于此,美国国立卫生研究院(NIH)与食品药品监督管理局(FDA)正积极推动新方法学(NAMs)战略,逐步减少对传统动物实验的依赖^[10]。全球类器官市场规模预计将以超过 22% 的年复合增长率扩张,有望在 2033 年达到 66 亿美元^[11]。政策与市场的双重驱动,使类器官技术成为连接基础研究、药物研发与临床转化的核心桥梁。在上述技术革新的背景下,小肠类器官能够精准再现小肠上皮的细胞多样性、隐窝-绒毛结构及区域特异性功能,成为口服药物吸收与代谢研究中最具前景的体外模型之一。

1.1 从技术演进到生理模拟

类器官是一类利用成体干细胞(ASCs)或多能干细胞(PSCs)在体外三维培养体系中自组织形成的微型组织,能够高度模拟来源器官的组织架构、细胞多样性和生理功能^[12]。小肠类器官的构建主要依赖 2 种技术路径。其一,基于 Lgr5⁺肠道干细胞的成体干细胞来源类器官,该体系通过在富含层黏连蛋白的基质胶(如 Matrigel®)中模拟肠道干细胞微环境,并利用由 R-spondin 1(激活 Wnt 通路以维持干细胞增殖)、头蛋白(Noggin,抑制 BMP 通路以防止过早分化)和表皮生长因子(EGF,促进细胞存活)组成的 ENR 培养体系,使干细胞自组织形成具有隐窝-绒毛结构的 3D 囊泡^[13-14]。2011 年, Sato 团队^[15]进一步优化人源类器官培养条件,通过添加烟酰胺、间变性淋巴瘤激酶(ALK)抑制剂和 p38 抑制剂,实现了人小肠上皮组织的长期稳定扩增。其二,基于诱导多能干细胞(iPSCs)的类器官体系,通过定向分化模拟胚胎肠道发育过程,可生成包含上皮及间质成分的内脏类器官,适用于发育生物学研究与遗传性肠病模型构建^[12,16]。无论采用哪种来源,小肠类器官的培养均需经历扩增-分化的时序调控:扩增阶段维持高干性信号以促进细胞增殖,

分化阶段则撤除 Wnt 激动剂（或添加 Notch 抑制剂），诱导干细胞向成熟肠上皮细胞转化^[17]。

小肠类器官的核心优势在于其高度保留了真实小肠的生物学特性。在细胞多样性方面，类器官中同时存在负责营养吸收的肠上皮细胞、分泌黏液的杯状细胞、分泌抗菌肽的潘氏细胞以及分泌激素的肠内分泌细胞，这种多谱系组成使其在细胞构成上接近真实组织^[17]。在结构与功能方面，类器官能够形成隐窝-绒毛样结构，并表达紧密连接蛋白[如闭合小带蛋白-1（ZO-1）、闭合蛋白（Occludin）]及刷状缘酶（如蔗糖酶-异麦芽糖酶），从而建立起功能性的肠道屏障^[5,18]。转录组学证据进一步表明，人源小肠类器官与真实小肠组织在基因表达谱上具有高度相关性，其转运体[如 P-糖蛋白（P-gp）、乳腺癌耐药蛋白（BCRP）、肽转运蛋白 1（PEPT1）]和代谢酶[如细胞色素 P450 3A4 酶（CYP3A4）]的表达水平更接近体内状态，显著优于传统的 Caco-2 细胞模型^[16,19]。这些特性使小肠类器官构建的药物吸收评价模型更接近人体生理环境。

1.2 3D 小肠类器官在药物评价中的局限性

尽管小肠类器官在细胞多样性和组织相似性方面具有显著优势，但其固有的“顶膜内翻”结构，为药物评价带来了严重的物理障碍。在这一结构中，负责药物吸收的顶端膜朝向封闭的囊腔内部，极大地限制了其在吸收动力学研究中的应用。为解决这一难题，研究者探索了将 3D 类器官或 enteroids（来源于肠道干细胞的肠上皮类器官）解离后接种于 Transwell 或其他平面支撑物上，使上皮细胞形成顶端面可直接暴露于培养基的极化 2D 单层模型。Kozuka 等^[20]建立并表征了人和小鼠小肠/大肠来源的上皮细胞单层平台，结果显示该模型可形成紧密连接和极化结构，并保留一定的肠上皮谱系特征，为药物转运、屏障功能和顶端侧暴露研究提供了更易操作的模型体系。通过培养条件的精确调控，研究者还构建了极性反转的“apical-out”类器官，同样实现了对顶端膜的直接接触^[21]。Davoudi 等^[22]则另辟蹊径，利用基底侧给药的策略，通过成像观察药物在囊腔内的积累，以此验证了 P-gp 的外排功能和纳米粒的跨上皮转运。

然而，这些策略在操作便捷性、实验通量和定量准确性方面仍存在局限，难以满足药物早期开发的高通量筛选需求。因此，如何将具有“顶膜内翻”结构的 3D 类器官，转化为一种极性正确、顶端易

于接触且适用于高通量实验的 2D 屏障模型，成为该领域亟待解决的技术挑战^[23-24]。

为了克服这一物理障碍，研究者开始探索将 3D 类器官转化为 2D 单层膜屏障模型，以构建更具生理相关性且易于操作的药物评价平台^[23]。值得关注的是，Gill 等^[25]的最新研究证实，经肠类器官与微流控芯片耦合构建的“肠芯片”模型，已成功复现人小肠的蠕动、黏液分泌及微生物共培养微环境，在模拟口服药物首过代谢与肠道菌群介导转化方面展现出前所未有的预测能力。

2 从 3D 类器官到 2D 屏障模型的关键转化技术

3D 肠道类器官能够较好保留来源组织的细胞组成和区域特征，但其封闭腔样结构限制了药物对顶端腔面的直接暴露，也不利于跨上皮通透性、跨上皮电阻（TEER）及转运功能的连续定量检测。为提高模型在药物吸收评价中的可操作性和可重复性，研究者发展了将 3D 类器官回收、去除基质并消化为单细胞或小细胞团后，重新接种于 Transwell、芯片或其他平面支撑材料表面，使其形成具有顶端-基底侧极性和紧密连接结构的 2D 上皮屏障模型的技术体系^[23,26]。这一转化过程并非简单的“从立体到平面”的物理铺展，而是伴随细胞黏附、增殖、分化、极性重建及屏障功能成熟的动态重塑过程；其中，去胶效率、消化程度、接种密度、包被基质、培养基组成和增殖-分化时序等参数均会影响单层闭合速度、屏障稳定性及药物转运/代谢相关功能。若上述条件控制不当，可能出现细胞贴附不足、局部多层化、TEER 波动、紧密连接不连续或吸收相关功能不足等问题。因此，3D 类器官向 2D 屏障模型的转化应被视为一个需要参数优化和质量控制的关键建模环节，而非单纯的操作流程。

2.1 类器官的回收与去胶

类器官的回收与去胶是 3D 类器官向 2D 屏障模型转化的起始环节，其目的不仅是将类器官从基质胶中释放出来，更重要的是在尽量减少机械损伤和细胞丢失的前提下，获得状态一致、残胶较少且适合后续消化和接种的类器官群体。由于小肠类器官通常包埋于基质胶或基底膜提取物（BME）等基质胶圆顶中培养，基质胶的溶解程度会直接影响后续酶消化效率、细胞计数准确性、接种均一性及单层膜形成质量。已有操作流程多采用预冷的细胞回收液、温和细胞解离试剂或冰冷基础培养基/磷酸盐缓冲液（PBS）处理基质胶圆顶，并在冰上孵育 20~

60 min, 期间配合轻柔吹打或间断颠倒混匀, 使基质胶逐渐液化并释放类器官^[26,27]。与单纯追求“完全回收”相比, 该步骤更强调回收条件的温和性和终点判断, 即显微镜下应观察到基质胶团块明显减少、类器官从胶中游离, 且类器官总体结构未出现明显破碎或大量细胞碎片。

类器官初始状态是影响回收质量的重要因素。通常宜选择处于扩增期、大小较均一旦未明显过度囊泡化或坏死的类器官; 过大、囊泡化明显或长期培养类器官在回收和吹打过程中更易破裂, 后续消化后也更容易出现细胞存活率下降、贴附率低和单层形成不均等问题^[27]。因此, 在回收前可记录类器官培养天数、传代次数、每孔类器官数量、平均直径及形态特征, 并将其作为后续模型重复性分析的重要来源。对于用于单层模型构建的类器官, 部分商品化流程建议使用培养 7~8 d、传代次数不超过 15 代且每孔数量相对充足的类器官, 并提示供体差异、培养质量和生长天数均会影响后续接种效率。

去胶不充分是该步骤最常见的失败原因之一。残留基质胶可表现为离心后细胞沉淀上方出现白色或半透明絮状物, 也可在显微镜下形成胶块包裹类器官或细胞团。残胶过多会降低消化酶与类器官上皮的接触效率, 使后续消化不均, 造成大块细胞团残留、细胞计数偏低或接种后局部堆积; 同时, 基质胶残留还可能影响后续蛋白质组、转运体表达或药物吸附相关检测的解释。已有研究比较了细胞回收液、分散酶和含 EDTA 的磷酸盐缓冲液 (PBS-EDTA) 等不同基质胶去除方法^[28], 发现不同方法在基质胶去除效率和残留污染方面存在差异, 其中分散酶在蛋白质组样本制备中显示出较高的肽段产量和较低的基质胶污染, 提示基质胶去除方式本身可能影响下游分析结果。因此, 在药物吸收评价模型构建中, 去胶步骤不宜仅作为前处理操作, 而应作为影响模型均一性和数据可靠性的关键质量控制点。

为减少回收过程中的细胞损失和机械损伤, 操作中可采用低吸附枪头和离心管, 必要时预先用培养基润洗枪头或适当剪宽枪头末端, 以降低类器官黏附于塑料表面或因反复通过狭窄枪头而破裂的风险^[27]。若离心后仍可见明显残胶, 可加入冰冷缓冲液或回收液再次短时间孵育并重复洗涤; 若出现类器官大量破碎、沉淀松散或细胞碎片明显增多,

则提示吹打过强、孵育时间过长或类器官初始状态不佳, 应在后续实验中调整类器官收获时间、降低机械剪切强度或优化去胶试剂。

2.2 消化时机与条件优化

消化过程是将完整 3D 类器官转化为可接种细胞悬液的关键步骤, 其目标并非单纯获得完全单细胞化悬液, 而是在“充分解离”和“维持细胞活性”之间取得平衡。消化程度直接影响细胞贴附、铺展、单层闭合和后续屏障稳定性: 消化不足时, 残留的大块类器官碎片或细胞团可造成接种不均、局部多层化和 TEER 波动; 消化过度则可能破坏细胞间连接及细胞表面黏附分子, 增加失巢凋亡风险, 导致细胞存活率下降、贴壁率降低和屏障形成延迟。因此, 消化条件应根据类器官来源、培养天数、大小、囊泡化程度和实验目的进行动态优化, 而不宜仅依赖固定时间。

目前常用的消化试剂包括 TrypLE™ Select/Express、Accutase、Accumax 及低浓度 trypsin/EDTA 等。TrypLE™ 为重组酶制剂, 成分相对明确、批间差异较小, 适用于将人肠道类器官制备为单细胞悬液。Tanaka 等^[29]在建立人十二指肠类器官来源药物吸收单层模型时, 将细胞消化方式列为影响模型稳健性的关键参数, 并以细胞生长面积和 TEER 作为评价指标; 结果显示, 与 0.05% trypsin/EDTA 相比, TrypLE™ 处理后单层细胞生长面积和 TEER 表现更佳, 因此最终选择 TrypLE™ 作为消化酶。该研究的具体流程为: 类器官碎片经离心后加入 2.5×TrypLE™ Select, 在 37 °C 水浴中消化 5~10 min, 再经吹打、70 μm 滤网滤过、离心和计数后接种于 Transwell^[29]。这提示消化酶的选择不应仅依据操作习惯, 而应结合单层形成效率、TEER 和后续功能指标进行筛选。

消化终点应通过显微镜动态判断。一般而言, 当类器官结构松散、边缘模糊, 并解离为单细胞或少量小细胞团, 而未出现大量细胞碎片、死亡细胞或黏稠絮状 DNA 样物质时, 可及时终止消化。对于以均一单层和高贴附效率为目标的模型, 也可采用较温和的 Accutase 或 Accumax 进行单细胞化处理。Felsenthal 等^[26]报道, 采用 Accumax 或 Accutase 将小肠类器官消化为单细胞悬液, 有助于提高细胞存活率和接种细胞的贴附效率, 并可形成较均一、自组织化的肠上皮单层。相比之下, 部分猪肠道类器官 2D 模型采用 0.05% trypsin/EDTA 于 37 °C 消化 5 min, 并通过较强机械吹打进一步分散细胞, 随后

按一定细胞数接种于 Transwell; 该方法可形成稳定的猪空肠和结肠类器官来源单层, 但其酶种类、机械分散强度和培养周期与人源药物吸收模型并不完全相同, 提示不同物种和肠段来源模型的消化参数仍需分别优化^[30]。

实际操作中, 可将“消化不足-适度消化-消化过度”作为质量控制框架。消化不足的表现包括悬液中大量团块较多、滤过后细胞回收率低、接种后细胞分布呈斑片状或局部堆积; 此时可适当延长消化时间、增加轻柔吹打次数或优化去胶步骤。消化过度则表现为细胞碎片增多、台盼蓝阳性细胞比例升高、离心后沉淀松散、接种后 24 h 贴附率低或细胞边缘收缩; 此时应缩短酶处理时间、降低吹打强度, 并在接种早期加入 ROCK 抑制剂以降低单细胞化引起的失巢凋亡风险。对于药物吸收评价模型, 可将细胞存活率、细胞团大小分布、滤过后回收率、24 h 贴附率、单层闭合速度和 TEER 动态曲线作为消化条件优化的核心指标, 而不仅以“是否形成细胞悬液”作为判断标准。获得状态良好的单细胞或小细胞团悬液后, 接种密度与包被基质的选择将进一步决定单层膜的均一性和屏障功能。

2.3 接种密度与包被基质的选择

接种密度和包被基质共同决定类器官来源细胞在平面支撑物上的贴附、铺展、闭合速度及屏障成熟质量, 是 3D 类器官向 2D 屏障模型转化中最需要根据模型用途进行优化的参数之一。与传统细胞系不同, 类器官来源细胞对消化程度、供体差异、肠段来源和基质条件更为敏感, 因此不宜将某一固定细胞密度简单作为通用标准。总体而言, 接种密度过低时, 细胞间接触不足, 易出现裸露膜区、闭合延迟、TEER 上升缓慢和旁细胞通透性偏高; 接种密度过高时, 则可能形成局部细胞堆积或多层化结构, 影响顶端-基底侧极性建立, 并导致药物表观通透系数评价产生偏差。因此, 接种密度的优化应结合 24~48 h 贴附率、单层闭合时间、形态均一性、TEER 动态曲线和示踪物通透性等指标综合判断。

不同研究报道的接种密度差异较大, 提示该参数具有明显的平台和模型相关性。Tanaka 等^[29]在人十二指肠类器官来源药物吸收单层模型中, 将细胞浓度调整为 5.0×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 并以每孔 1.0×10^5 个接种于 24 孔 Transwell, 结合 TrypLE 消化和 iMatrix-511/纤连蛋白包被, 获得了具有较好药物吸收预测能力的单层模型。Masete 等^[31]在无 BME 包被的人

十二指肠 2D 类器官模型中比较了每孔 2×10^5 个和 5×10^5 个等条件, 发现较高接种量可缩短达到汇合的时间; 其后续实验多采用每孔 $(5 \times 10^5 \pm 1 \times 10^5)$ 个, 相当于约 8×10^5 个 $\cdot \text{cm}^{-2}$, 用于获得稳定的屏障和转运功能。而在猪结肠类器官来源 2D 模型中, Plenge 等^[32]将 1.5×10^5 个细胞接种于预先以 1:40 Matrigel/PBS 包被的 12 mm 细胞培养插入物, 并在培养第 8 天开始分化、第 10 天进行功能实验。这些结果说明, 接种密度应优先以膜面积、细胞来源和检测目的进行归一化和优化, 而不宜直接跨物种、跨肠段或跨平台套用。

包被基质的选择同样会影响单层形成效率和屏障功能。Matrigel 或 BME 因富含层黏连蛋白、胶原蛋白和多种基质相关因子, 长期以来被广泛用于类器官培养和单层模型包被; 但其来源于小鼠肿瘤 BME, 成分复杂且存在批间差异, 可能降低模型标准化程度, 并在药物扩散、转运或电阻检测中引入额外干扰。近年来, 胶原蛋白、纤连蛋白、层黏连蛋白片段及合成/定义明确的基质逐渐被用于替代或减少 Matrigel/BME, 以提高模型可重复性和可解释性。Tanaka 等^[29]系统比较了 Matrigel、I 型胶原、纤连蛋白、IV 型胶原和 iMatrix-511 等包被条件, 发现 iMatrix-511 可显著提高细胞生长面积和 TEER, 而 iMatrix-511 与纤连蛋白联合包被进一步促进细胞扩增; 研究人员还结合十二指肠类器官中整合素 $\alpha 6$ 亚基 (ITGA6)、整合素 $\beta 1$ 亚基 (ITGB1) 和整合素 $\beta 4$ 亚基 (ITGB4) 等整合素表达, 说明基质选择与细胞-基质黏附机制密切相关。因此, 包基质的选择不应仅基于“是否常用”, 还应结合肠段来源细胞的整合素表达、单层形成效率和下游功能检测需求。

对于药物吸收和跨上皮转运研究, 还需关注基质层本身可能带来的扩散屏障效应。Masete 等^[31]建立的无 BME 人十二指肠 2D 类器官模型显示, 在无 BME 包被条件下, 单层仍可形成稳定屏障, 并保留葡萄糖吸收、短链脂肪酸摄取和离子转运等十二指肠相关功能; 同时, BME 包被可能增加亚上皮阻力并在一定程度上影响主动离子转运信号。这提示, 对于以转运、通透性和药物吸收为核心终点的模型, 减少或去除外源性胶状基质有助于降低药物扩散解释中的混杂因素。然而, 无基质胶体系并非适用于所有条件。单细胞化程度高、细胞存活率低或供体增殖能力弱时, 缺乏基质支持可能导致贴附

不足或闭合失败；此时可通过提高接种密度、加入 ROCK 抑制剂、优化消化条件或采用定义明确的胶原/层黏连蛋白/纤连蛋白包被来改善模型稳定性。

因此，接种密度与包被基质的优化应遵循“用途导向”的原则：若模型主要用于药物吸收和转运评价，应优先选择能够形成均一单层、低背景扩散阻力且具有稳定 TEER 和示踪物通透性的条件；若模型主要用于细胞黏附、迁移、再生或力学研究，则可进一步考虑基质刚度、蛋白组成等因素。故接种密度和包被基质应作为配套参数共同优化，而非分别独立选择。

2.4 增殖与分化的时序调控

在类器官来源细胞完成贴附、铺展并逐渐形成连续单层后，培养体系需由“促进扩增和闭合”转向“诱导成熟和功能化”。这一过程的核心是通过阶段性调节 Wnt/R-spondin、表皮生长因子(EGF)、Notch、骨形态发生蛋白(BMP)/转化生长因子- β (TGF- β)及 p38/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等信号，平衡细胞增殖、上皮极性重建、屏障稳定性和吸收相关功能成熟。通常，接种后早期需要保留一定的干细胞维持和促存活信号，以促进单细胞或小细胞团贴附、扩增和单层闭合；待单层基本连续后，再降低 Wnt/R-spondin 等干细胞维持信号，并根据模型用途调整 EGF、Notch 抑制剂、维生素 D3 或其他诱导因子，以促进吸收细胞、杯状细胞和其他成熟肠上皮谱系的形成^[6,27]。因此，增殖与分化的时序调控应视为 2D 屏障模型构建中的功能优化环节，不仅是培养基更换步骤。

分化诱导的起始时间依据单层闭合状态和屏障稳定性确定。若在细胞尚未充分铺展或局部仍存在裸露膜区时过早诱导分化，细胞增殖修复能力下降，容易造成单层闭合延迟、局部缺损和 TEER 波动；若长期维持扩增状态，则模型中干/祖细胞比例偏高，吸收细胞成熟不足，转运体、代谢酶及刷状缘相关标志物表达偏低，难以满足药物吸收评价的功能要求。Wang 等^[28]指出，人肠道类器官可通过撤除维持干细胞状态的生长因子并加入谱系诱导因子，在约 5 d 内获得不同成熟细胞组成；但终末分化后类器官活性可在数天内明显下降，因此功能实验应在分化成熟与细胞状态稳定之间选择合适窗口。这一原则同样适用于 2D 屏障模型，即分化诱导应以单层连续性、TEER 平台、细胞形态和功能标志物为依据进行动态判断。

对于药物吸收评价模型，分化条件还需兼顾屏障稳健性和药物处置功能。Tanaka 等^[29]在人十二指肠类器官来源单层模型中，将扩增培养基和分化培养基组成列为影响模型稳健性的关键因素，并以 TEER、禁食状态模拟肠液(FaSSIF)耐受性、药物吸收相关基因表达和 CYP3A 活性作为评价指标。该研究显示，去除 Wnt3a、R-spondin1、烟酰胺(nicotinamide)和 SB202190 的分化培养基可促进分化，增加蔗糖酶-异麦芽糖酶(SI)、肠碱性磷酸酶(ALPI)、腺苷三磷酸结合盒 B 家族成员 1(ABCB1)、CYP2C9 和 CYP3A4 等肠上皮成熟及药物吸收相关基因表达；但某些培养条件可引起 TEER 短暂下降和细胞从 Transwell 脱落，提示分化诱导过强或培养基组合不当会削弱屏障稳定性^[29]。进一步比较 EGF 条件时，去除 EGF 可提高 SI、ABCB1、CYP2C19 和 CYP3A4 表达，提示吸收细胞成熟度提高；但 EGF 去除时间较长时，模型对 FaSSIF 的耐受性下降，说明过度追求成熟可能牺牲药物吸收实验所需的屏障稳健性^[29]。因此，药物吸收模型的分化方案应以“成熟度-屏障稳定性-实验耐受性”三者平衡为优化目标。

近年来的研究还提示，可通过核受体通路进一步提高药物代谢和转运相关功能。Tanaka 等^[29]最终采用 4 d 扩增加 6 d 分化的培养流程，并在分化末期加入 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 维生素 D₃；该处理可诱导 ABCC2、CYP2C 和 CYP3A4 等吸收相关基因表达，并提高 CYP3A 活性，使部分低表达基因接近原代肠上皮细胞水平。用该模型对 19 种上市药物的评价结果表明，表观渗透系数(P_{app})与人体吸收分数(F_a)具有较好相关性， R^2 为 0.88，提示合理的分化时序和功能诱导可显著提高类器官来源单层模型在药物吸收预测中的应用价值^[29]。Yamashita 等^[33]建立的人活检来源十二指肠类器官单层模型也显示，单层可在 3~8 d 内形成极化吸收细胞和紧密连接，并表现出高于 Caco-2 细胞的药物代谢酶和转运体功能，进一步说明分化状态是决定药物吸收评价可靠性的关键因素。

分化程度的验证应采用形态、谱系标志物和功能指标相结合的方式。形态学上，可观察细胞由高增殖、铺展状态逐渐转为极性明确的柱状上皮样结构，并通过绒毛蛋白(Villin)、F-肌动蛋白(F-actin)、闭锁小带蛋白-1(ZO-1)、闭合蛋白(OCLN)或紧密连接蛋白(CLDN)等染色确认刷状缘和紧密连

接结构。谱系标志物方面,可检测吸收细胞标志物 SI、ALPI、Villin,进行杯状细胞标志物黏蛋白 2 (MUC2)/过碘酸-希夫(PAS)染色,以及必要时检测嗜铬粒蛋白 A(CHGA)、LYZ、双皮质素样激酶 1(DCLK1)等内分泌细胞、Paneth 细胞和 tuft 细胞相关标志物。功能层面,则应重点评价与药物吸收相关的 ABCB1/P-糖蛋白(P-gp)、ABCG2/BCRP、溶质载体(SLC)转运体、CYP3A4、羧酸酯酶 2(CES2)、葡萄糖苷酸(UGT)等表达或活性,并结合 TEER、Lucifer yellow 或荧光素异硫氰酸酯-葡聚糖(FITC-dextran)通透性检测判断屏障完整性。Klein 等^[34]进一步研究表明,小肠类器官的增殖状态和分化状态会影响药物毒性评价结果,不同分化状态下小分子化合物的毒性反应可产生差异,提示在药物评价中必须明确模型所处的分化阶段,并避免将不同成熟度模型的结果直接比较。

因此,增殖与分化的时序调控应以模型应用目的为导向:若用于药物吸收和代谢/转运研究,应优先获得稳定屏障、成熟吸收细胞表型及可检测的转运体和代谢酶功能;若用于再生、损伤修复或干细胞行为研究,则可保留更高比例的增殖细胞。实际建模中,应同步记录分化起始时间、分化持续时间、培养基关键因子、TEER 变化、细胞活率、紧密连接连续性和吸收相关功能指标,以提高不同实验批次和不同研究之间的可比性。

2.5 屏障形成的监测与验证

屏障形成的监测与验证是判断 3D 类器官是否成功转化为功能性 2D 屏障模型的关键环节。由于类器官来源单层膜的屏障强度受供体来源、肠段类型、接种密度、包被基质、培养基组成和分化状态等因素影响,故应结合 TEER 动态变化、旁路通透性、紧密连接结构、上皮极性以及药物吸收相关功能进行综合评价。通常,TEER 值随细胞贴附、铺展和单层闭合逐渐升高,并在屏障成熟后进入相对稳定平台期;若 TEER 长期不升高、波动明显或达到平台后迅速下降,常提示细胞密度不足、单层存在缺损、分化条件不当、细胞脱落或紧密连接受损。

不同模型报道的 TEER 平台值差异较大。例如,在 Masete 等^[31]建立的人十二指肠无 BME 2D 类器官模型中,以 $TEER > 100 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 作为单层汇合的判定标准;在接种 5×10^5 个细胞的条件下,BME 包被组和无 BME 组在第 14 天的校正 TEER 分别为 $(326.3 \pm 12.5) \Omega \cdot \text{cm}^2$ 和 $(255.3 \pm 4.2) \Omega \cdot \text{cm}^2$ 。Plenge

等^[32]建立的猪结肠类器官来源 2D 模型在培养第 8 天平均 TEER 为 $(187.4 \pm 28.3) \Omega \cdot \text{cm}^2$,并结合电镜、紧密连接基因表达和 Ussing chamber 功能实验验证模型完整性。Tanaka 等^[29]在人十二指肠类器官来源药物吸收模型中也将 TEER 作为培养条件筛选指标之一,但同时结合 FaSSIF 耐受性、Lucifer Yellow 通透性、 P_{app} 、转运体/代谢酶表达和 CYP3A 活性评价模型功能。这些结果说明,TEER 更适用于同一体系内的动态质控和批间比较,而不是作为跨模型通用阈值。

旁路通透性检测是 TEER 的重要补充。TEER 主要反映离子通透性,而 Lucifer Yellow、FITC-dextran 或其他相对分子质量明确的示踪物可用于评价小分子或大分子经旁细胞通路跨膜转运的程度。对于药物吸收评价模型,Lucifer Yellow 的 P_{app} 常被用作屏障完整性和实验耐受性的判定指标。Tanaka 等^[29]在 FaSSIF 条件下采用 Lucifer Yellow 评价屏障功能,并参考 Caco-2 渗透性实验中 Lucifer Yellow P_{app} 低于 $1.0 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 的常用标准;其模型在多批次和多供体实验中均能维持较低 Lucifer Yellow 通透性,提示单层屏障具有较好的重复性和稳健性。Masete 等^[31]则采用 4×10^3 FITC-dextran 和 4.4×10^4 辣根过氧化物酶(HRP)分别评价旁细胞转运和转胞转运,并证明肿瘤坏死因子(TNF)- α 刺激可降低 TEER、增加 FITC-dextran 和 HRP 通透性,从而验证模型对屏障损伤刺激的响应能力。因此,屏障验证不应仅证明“电阻升高”,还应证明示踪物通透性处于可接受范围,并可对屏障破坏因素作出合理响应。

紧密连接蛋白的表达和定位是判断屏障结构完整性的另一关键指标。免疫荧光检测中,ZO-1、Occludin、密封蛋白(Claudin)家族蛋白和三细胞紧密连接蛋白(Tricellulin)等应在细胞边界呈连续、环状或网格状分布,而非仅表现为弥散性胞质信号。若出现 ZO-1/Occludin 边界信号中断、局部缺失、细胞间隙扩大或细胞重叠堆积,即使 TEER 暂时较高,也可能提示单层结构并不均一。Masete 等^[31]在人十二指肠 2D 类器官模型中观察到 Occludin 随培养时间延长而更为稳健,并进一步验证 ZO-1 与双细胞连接处 Occludin、三细胞连接处 Tricellulin 的共定位。Plenge 等^[32]在猪结肠 2D 类器官模型中也检测了 *CLDN2*、*CLDN3*、*OCLN* 和 *ZO-1* 等紧密连接相关基因,并结合 TEER 和电镜观察

证实模型形成了完整上皮屏障。

除屏障完整性外,药物吸收评价模型还应验证上皮极性和吸收相关功能。形态学上,可通过 Villin、F-actin、刷状缘结构、微绒毛和黏液分泌等指标判断顶端面成熟和细胞极性;谱系组成上,可检测吸收细胞标志物 SI、ALPI、Villin,杯状细胞标志物 MUC2/PAS 染色,以及必要时检测内分泌细胞、Paneth 细胞或 tuft 细胞相关标志物。功能层面,应进一步评价与药物处置相关的 ABCB1/P-gp、ABCG2/BCRP、SLC 转运体、CYP3A4、CES2 和 UGT 等表达或活性。Yamashita 等^[33]建立的人活检来源十二指肠类器官单层模型在 3~8 d 内形成极化吸收细胞和紧密连接,并表现出较强的 P-gp 和 CYP3A4 功能,提示类器官来源单层模型可用于药物转运和代谢研究。Tanaka 等^[29]进一步以 19 种上市药物验证人十二指肠类器官来源单层模型的吸收预测能力,结果显示体外 P_{app} 与 F_a 之间具有较好相关性, R^2 为 0.88。因此,对药物吸收评价而言,理想模型不仅应具有完整屏障,还应具备可检测、可重复且与人体肠上皮相关的转运和代谢功能。

综上,2D 屏障模型的质量控制应采用分层验证策略:首先,通过显微镜观察和 TEER 动态曲线确认单层闭合和稳定性;其次,通过 Lucifer Yellow、FITC-dextran 等示踪物检测旁细胞通透性;再次,通过 ZO-1、Occludin、Claudin 和 Tricellulin 等紧密连接蛋白定位验证结构完整性;最后,结合 Villin、SI、ALPI、MUC2、ABCB1、ABCG2、CYP3A4 等标志物或功能实验确认模型成熟度和药物吸收相关功能。若出现 TEER 持续偏低、示踪物 P_{app} 升高、紧密连接信号不连续、细胞局部脱落或转运/代谢功能不足,应回溯分析接种密度、消化损伤、包被基质、分化时序和培养基组成等上游环节,而不应仅通过延长培养时间进行补救。

3 2D 屏障模型的平台构建: Transwell 与芯片

成功转化的 2D 类器官单层膜需要合适的承载平台才能发挥其药物评价功能。目前,主流平台可分为 2 大类:以 Transwell 为代表的静态培养系统和以微流控芯片为代表的动态培养系统。2 类平台在设计理念、操作复杂度、生理仿真度和应用场景上各具特色,研究者需根据具体研究目标进行权衡选择^[35-37]。

3.1 Transwell 平台: 标准化与高通量

Transwell 平台凭借其操作简便、成本低廉和高

度标准化的特点,目前仍是药物渗透性初筛的首选。它允许研究者方便地进行双向转运实验,计算 P_{app} ^[5]。然而,Transwell 的静态培养环境通常缺乏流体剪切力和机械形变,难以模拟肠道的蠕动和血流冲刷,这可能限制细胞的分化成熟程度,并影响某些体内外相关性高制剂行为的预测^[23]。

3.2 芯片平台: 生理仿真与动态监测

近年来,器官芯片(Gut-on-a-chip)技术通过引入微流控系统,显著提升了模型的生理相关性。芯片平台能够模拟肠道的流体剪切力(通常为 $0.01 \sim 10 \text{ dyn} \cdot \text{cm}^{-2}$)和周期性机械应变(如 10% 位移, 0.15 Hz),这些物理信号被证明显著影响肠上皮形态发生,并能诱导细胞形成更成熟的绒毛状结构^[38-39]。值得注意的是,流体剪切力的水平本身就可以差异化调控屏障特性: Mennella 等^[40]发现,在芯片中施加不同强度的剪切力,可导致上皮屏障在旁细胞通透性和跨细胞摄取效率上产生显著差异,提示可通过调节剪切力实现对药物转运途径的精细化调控。此外,近年涌现的工程学创新,正在突破传统芯片操作复杂、集成度不足的限制。已有无泵驱动设备(如 VitroFlo)被成功开发,其通过被动流控机制实现了与生理环境相当的剪切力刺激,且支持多模块并行实验^[41]。

此外,3D 生物打印的应用也取得了重要进展。Purdue 大学的研究团队^[42-43]利用先进的 3D 打印技术与脱细胞细胞外基质(dECM)材料,构建了具有真实隐窝-绒毛几何结构的肠道模型,并证实 3D 结构本身会影响 P-gp 等转运蛋白的功能,这是传统平面模型难以做到的。与此同时,集成化传感器技术也从单一的终点评估,发展到实时监测屏障功能:世界精密仪器公司(WPI)与 SynVivo 合作推出了 EVOM™ Chip,利用嵌入式电极实现了器官芯片上的多通道 TEER 实时测量^[44]。近年来,将 TEER 测量电极直接集成于器官芯片的技术,实现了在不干扰培养环境的前提下,对屏障功能进行实时、连续、非侵入性的自动化监测^[45]。

3.3 平台对比与适用场景

Transwell 与芯片平台并非简单的“先进”与“落后”关系,而是具有不同适用边界的模型体系。Transwell 系统结构简单、操作成熟、成本较低、通量较高,便于进行 TEER、旁路通透性和 P_{app} 等标准化检测,因而更适用于药物研发早期的化合物渗透性初筛、屏障完整性评价和批量条件优化。芯片平台

则可引入流体剪切力、机械拉伸、氧梯度、共培养和多器官连接等动态因素,更适合用于研究肠上皮成熟、药物代谢机制、肠道-微生物互作、炎症/毒性反应以及生理相关性较高的机制验证^[37,46-47]。

然而,目前关于 Transwell 与芯片平台在药物吸收评价中的直接定量比较仍相对有限,尤其缺乏在相同细胞来源、相同培养基、相同药物组合和相同分析方法下,对 P_{app} 、外排比、代谢产物生成量和人体吸收相关性的系统头对头研究。因此,不能简单推断芯片平台在所有药物吸收评价场景中均优于 Transwell。Moyer 等^[48]比较了 Caco-2 细胞、人空肠和十二指肠类器官来源细胞以及 EpiIntestinal™ 微组织在静态 Transwell 和流动微生理系统平台中的表现,并检测了 TEER、右旋糖酐(dextran)泄漏以及咖啡因、普萘洛尔和吡哆美辛 3 种小分子的通透性。该研究显示,肠类器官来源细胞在部分形态学和屏障指标上优于 Caco-2 细胞,而微生理系统(MPS)培养可带来一定上皮结构改善,但同时也引入了更高变异性,尤其是在肠类器官来源细胞中更为明显;此外,该研究涉及药物种类有限,尚不足以得出跨药物类别的普适性结论。

已有研究开始对 Transwell 与流动培养或肠道芯片平台进行直接比较,但相关证据仍处于积累阶段,其结论更适合用于界定不同平台的适用情境,而不宜直接外推为“芯片平台全面优于 Transwell”。Moyer 等^[48]比较了 Caco-2 细胞、人空肠和十二指肠 enteroid 来源细胞以及 EpiIntestinal™ 组织在静态膜培养和流动 MPS 条件下的屏障通透性表现,结果显示流动培养可在一定程度上改善部分模型的上皮形态和屏障相关指标,但同时也可能增加实验变异性;且该研究所涉及的小分子药物种类有限,因此其结果更适合作为平台比较的初步证据,而非普适性结论。Gleeson 等^[49]在 Caco-2 Transwell 与 Caco-2 gut-on-a-chip 模型中比较口服肽制剂及渗透促进剂的评价效果,发现芯片模型中渗透促进效应较 Transwell 更为温和,并与离体和体内结果更为接近,提示动态微环境可能有助于减少传统静态模型对促渗效应的高估。Moerkens 等^[50]进一步比较了人诱导多能干细胞(hiPSC)来源肠上皮细胞在类器官、Transwell 和 intestine-on-chip 系统中的转录组特征,发现芯片培养条件下消化、营养转运和药物代谢相关基因表达增强,提示芯片平台可能促进肠上皮成熟;但该研究主要基于基因表

达和细胞组成分析,并不能直接等同于 P_{app} 、外排比或代谢清除能力的定量优势。因此,当前证据更支持基于研究目的和评价终点选择平台,即 Transwell 更适合标准化、较高通量的渗透性筛选,而芯片平台更适合动态微环境、制剂促渗、成熟度提升和机制验证等特定研究场景。

基于现有证据,若研究目标是建立可重复、可比较、适合中高通量检测的药物渗透性筛选体系,Transwell 仍是更现实和更易标准化的选择;若研究目标涉及流体剪切力、机械刺激、微生物共培养、肠-肝轴或复杂毒性机制,芯片平台则更具方法学优势。未来需要采用统一细胞来源、统一培养基和统一药物探针集,在 Transwell 与芯片平台中同步测定 P_{app} 、TEER、旁路示踪物通透性、转运体功能、代谢产物生成量和人体 F_a /肠道有效渗透系数(P_{eff})相关性,才能更客观地评价 2 类平台在药物吸收预测中的相对价值。

4 药物吸收评价的应用案例

无论采用 Transwell 还是微流控芯片平台,2D 类器官屏障模型的构建最终都指向同一个目标——为药物研发提供更接近人体生理的体外评价工具。相较于传统 Caco-2 模型,类器官来源模型保留了更接近人体的细胞多样性、转运体表达谱和代谢酶活性;相较于动物模型,它提供了可规模化、可重复的人源化平台,同时规避了种属差异带来的预测偏差^[6,25]。本文从渗透性评价、转运体功能、代谢研究和毒性评估 4 个维度,系统展示该类模型在药物吸收评价中的具体应用案例,并重点阐述其相较于传统模型的独特优势。

4.1 渗透性评价与 P_{app} 计算

P_{app} 是评价药物吸收能力的核心参数,计算公式为: $P_{app} = (dQ/dt) / (A \times C_0)$, 其中 dQ/dt 为接收室药物累积量的线性变化速率, A 为膜面积, C_0 为供试室初始浓度^[3]。根据生物药剂学分类系统的划分标准^[51], P_{app} 值大于 $1 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 的药物属于高渗透性,介于 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 为中渗透性,低于 $1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 则为低渗透性。

Hudson 等^[52]系统比较了人小肠类器官来源 2D 单层膜与 MDCK 细胞模型在预测来那度胺口服吸收中的表现;结果显示,类器官模型测得的 P_{app} 值为 $6 \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 而 MDCK 单层膜测得的 P_{app} 值显著偏低(约 $2 \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$), 与其体内高生物利用度(68%~120%)不符。进一步分析表明,类器

官模型能够更好地捕捉转运体介导和旁路途径介导的药物渗透性效应,从而实现更准确的人体吸收预测^[52]。类似地,Ayehunie 等^[53]利用人原代细胞来源的小肠微组织模型评价了 11 种模型药物的渗透性,发现该模型能够有效区分低渗透性与高渗透性药物,且与人体吸收数据的相关系数($R^2=0.91$)优于 Caco-2 细胞($R^2=0.71$)。

4.2 转运体功能研究

转运体介导的主动转运是决定药物肠道吸收、分布和排泄的关键因素,其中外排转运体(如 P-gp、BCRP)可限制口服药物的生物利用度,而摄取转运体(如 PEPT1)则促进特定底物的吸收。与传统单一细胞系相比,类器官来源的 2D 屏障模型可在一定程度上保留肠上皮相关转运体的表达和功能,并可用于 P-gp、BCRP、PEPT1 等转运体功能评价^[54,55]。

转运体功能研究通常采用双向转运实验结合抑制剂验证的策略:分别测定药物从顶端到基底侧(A→B)和从基底侧到顶端(B→A)的 P_{app} ,计算外排比($ER=P_{app\ B\rightarrow A}/P_{app\ A\rightarrow B}$)。当 $ER>2$ 时,提示可能存在主动外排机制;加入特异性抑制剂(如 P-gp 抑制剂 MK 571、BCRP 抑制剂 Ko143)后,若 ER 显著下降,则可确认特定转运体的参与^[55]。Kasendra 等^[56]利用人十二指肠芯片模型成功验证了 P-gp 和 BCRP 的功能活性,同时采用 LC-MS/MS 定量检测证实,芯片上皮细胞中 P-gp 和 BCRP 的蛋白表达水平与成人十二指肠组织高度一致。此外,Zietek 等^[57-58]利用小鼠和人小肠类器官 3D 模型验证了 PEPT1 的摄取功能,通过放射性同位素标记的甘氨酸肌氨酸(Gly-Sar, PEPT1 典型底物)摄取实验发现,在 PEPT1 基因敲除或加入特异性抑制剂头孢羟氨苄的条件下, Gly-Sar 的摄取显著降低,证实了功能性 PEPT1 在类器官体系中的存在。

4.3 代谢功能与首过代谢评价

肠道首过代谢是影响药物口服生物利用度的关键因素之一,其中细胞色素 P450 酶家族(尤其是 CYP3A4)在小肠上皮中高表达,负责代谢约 50% 的临床常用药物^[59]。类器官来源的 2D 屏障模型保留了接近生理水平的 CYP3A4 酶活性,为肠道代谢研究提供了可靠平台。

芯片平台中引入的流体剪切力可上调 CYP3A4 的表达和酶活性。使用 Caco-2 细胞的微流控芯片研究发现,动态培养条件下的代谢效率显著提高,证实了物理微环境对肠道代谢功能调控的重要性^[60]。

值得特别关注的是, Gill 等^[25]最新研究实现了药物渗透性与代谢的同步评估。他们利用人小肠类器官来源的生物工程肠上皮(BIE),同时测定了多种模型药物的 P_{app} ,并基于 CYP3A4 介导的代谢产物生成量,结合机制性建模成功预测了药物的肠道逸分数(F_g),解决了传统方法需将渗透数据与代谢数据分开建模再行整合的难题,显著提升了口服药物生物利用度的预测准确性^[25]。

最新的进展还包括将肠芯片与肝芯片物理耦联,构建“肠-肝轴”多器官芯片模型^[61-62]。采用含氟聚合物(PFPE)构建的肠-肝串联芯片,将肝脏隔室出流液中完整原型药物的检出率提高了 20 倍以上,通过最小化隔室间死体积,能够灵敏地观测代谢饱和及代谢酶抑制效应。这些进展为评估药物的系统代谢提供了更完整的生理模拟平台^[63]。

4.4 毒性评价与量化指标

类器官来源 2D 屏障模型在毒性评价中的价值,不仅在于能够检测细胞死亡或屏障破坏,更在于可将功能损伤、炎症反应、结构改变和分子机制纳入同一评价体系。与单一细胞活力检测相比,该类模型更适合从“屏障功能-细胞损伤-炎症应答-结构重塑-转运/代谢功能改变”5 个层面建立毒性评价框架。其中,TEER 可用于动态监测屏障完整性,但不宜被视为唯一判定标准;Lucifer Yellow、FITC-dextran 等旁路示踪物可补充评价旁细胞通透性;乳酸脱氢酶(LDH)释放、腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)含量或细胞活力检测可反映细胞损伤;IL-6、TNF- α 、IL-1 β 等细胞因子可用于判断炎症反应;ZO-1、Occludin、Claudin 等紧密连接蛋白定位及 F-actin/Villin 结构可反映上皮结构完整性。对于药物毒性研究,还应进一步结合转运体和代谢酶功能变化,以区分单纯细胞毒性、屏障毒性和药物处置功能扰动。

不同类型毒性研究的模型设计和终点选择存在明显差异,需避免将其结果直接等同比较。药物诱导胃肠道毒性研究通常更强调与临床腹泻、屏障损伤或治疗窗相关的预测性能。例如, Hoffman 等^[64]建立的 MPS 肠道毒性模型以 TEER 变化作为核心读数之一,对 23 种参考化合物进行评价,其中 15 种显示出与预期一致的结果,提示该类系统可用于药物诱导胃肠道损伤的早期筛查。Pike 等^[65]采用 2D 人肠干细胞来源模型评价 30 种已知临床腹泻风险药物,并将增殖、细胞丰度和屏

障形成作为读数,其预测准确率分别达到 91%、90% 和 88%,说明多终点联合分析较单一指标更有助于提升毒性预测能力。

对于非药物化学暴露,研究重点通常转向屏障损伤和炎症反应^[66]。Ogulur 等^[67]研究洗碗机清洁剂和漂洗剂残留对肠上皮屏障的影响,发现其中乙氧基化醇是诱导上皮炎症和屏障损伤的重要成分,相关损伤表现为屏障功能下降、紧密连接破坏及炎症因子改变。这类研究提示,类器官来源屏障模型可用于评价日常化学品或环境暴露对肠道屏障的潜在影响,但其暴露方式、浓度设定和临床外推逻辑不同于药物毒性筛选。

环境污染物和颗粒物研究则更依赖动态培养条件和在线监测。Han 等^[68]利用 gut-on-a-chip 模型研究纳米塑料诱导的肠道炎症,发现聚苯乙烯纳米颗粒可诱导屏障损伤和促炎因子升高;同时,增强类蠕动机机械刺激可减轻纳米塑料相关炎症反应,提示芯片模型中的机械微环境会显著影响毒性结果解释。因此,对于纳米颗粒、微塑料或其他环境污染物,除 TEER 和炎症因子外,还应关注颗粒沉积、跨膜转运、黏液层相互作用和机械刺激条件,否则静态模型可能低估或高估实际暴露风险。

此外,模型本身的分化状态也是影响毒性评价的重要变量。Klein 等^[34]比较了增殖期和分化期小肠类器官模型对小分子化合物的毒性反应,发现仅分化状态差异即可改变细胞活力检测中的毒性读数,并导致部分化合物在不同模型状态下呈现不同敏感性。这一结果提示,在进行药物毒性评价时,应根据研究目的选择模型状态:若关注干/祖细胞损伤、黏膜再生抑制或化疗相关腹泻,可考虑增殖型模型;若关注成熟吸收细胞、转运体/代谢酶相关毒性或屏障功能损伤,则分化型模型更具相关性。

综上,类器官来源 2D 屏障模型的毒性评价不宜简单归纳为“TEER 下降”或“细胞因子升高”,而应根据暴露类型和研究目的建立分层终点体系。药物毒性评价应强调临床相关性和预测性能,化学品暴露研究应强调屏障损伤与炎症机制,环境污染物研究应重视动态微环境和颗粒行为,模型优化研究则应明确细胞分化状态对毒性读数的影响。未来该领域需要在统一报告暴露剂量、暴露时间、模型来源、分化状态、培养平台和核心终点的基础上,建立可跨研究比较的毒性评价框架。

总体来看,小肠类器官来源 2D 屏障模型已在

药物渗透性评价、转运体功能研究、肠道首过代谢和毒性筛查等方面显示出应用潜力。与传统 Caco-2 模型相比,该类模型在人源性、区域特异性和部分转运/代谢功能方面具有一定优势;但其预测能力仍受供体差异、培养条件、分化状态、平台类型和终点选择影响。未来需要通过标准化模型构建、统一报告关键参数、开展更多头对头比较和临床相关性验证,进一步明确其在药物研发不同阶段中的适用边界。

4.5 中药活性成分吸收与中药源性胃肠道毒性评价

除化学药物外,小肠类器官来源屏障模型也为中药活性成分的肠道吸收、屏障调控及胃肠道安全性评价提供了新的研究工具^[69]。中药及天然产物通常具有成分复杂、多靶点和长期用药等特点,其口服疗效不仅取决于单一成分的跨上皮吸收,还与肠道屏障状态、转运体/代谢酶表达、肠道菌群代谢及局部炎症微环境密切相关。因此,类器官来源 2D 屏障模型可作为连接“成分暴露-屏障反应-吸收/毒性终点”的体外评价平台,用于初步筛选具有较好跨膜吸收潜力、屏障保护作用或胃肠道毒性风险的中药活性成分。

现有研究已提示该类模型在中药相关肠道作用评价中的应用潜力。例如,黄连来源生物碱小檗碱在小鼠肠类器官-巨噬细胞共培养模型中可减轻脂多糖(LPS)诱导的炎症反应和上皮损伤,并通过抑制 M1 型巨噬细胞极化、改善 ZO-1 表达和组织化状态,体现出对上皮-免疫互作的调控作用^[70]。另一项研究结合小鼠模型和人肠道类器官发现,小檗碱可缓解非甾体抗炎药(NSAID)诱导的小肠上皮屏障损伤,减轻 Claudin-1 和 Occludin 下调,并抑制炎症小体相关炎症反应^[71]。这些结果说明,类器官模型不仅可用于评价中药活性成分的屏障保护作用,也可用于解析其对炎症、紧密连接和上皮修复过程的直接影响。

与此同时,类器官模型也可用于识别中药或药食同源成分的潜在胃肠道毒性。Zhao 等^[72]利用肠道类器官分化模型筛选姜来源成分,发现 6-姜酚经高温或酸性条件可转化为 6-姜烯酚,而 6-姜烯酚可抑制肠隐窝干细胞分化,降低类器官表面积、隐窝芽数量和碱性磷酸酶活性,并在体内加重肠易激综合征相关表型。该研究提示,对于经炮制、胃酸环境或肠菌代谢后发生结构转化的中药成分,类器官模型有助于发现传统细胞系难以捕捉的上皮再生抑

制或分化毒性。

总体而言,中药相关应用可在现有药物吸收评价框架中进一步扩展为 3 个方向:一是利用类器官来源 2D 屏障模型测定代表性单体成分或复方拆方组分的 P_{app} 、外排比及转运体相关性;二是结合 TEER、旁路通透性、紧密连接蛋白和炎症因子评价中药成分对肠屏障的保护或损伤效应;三是引入肠道菌群共培养或芯片平台,分析中药成分在菌群代谢、屏障调控和宿主吸收之间的联动关系。未来若能将 LC-MS/MS 成分定量、类器官屏障功能检测和肠菌代谢分析结合,有望为中药口服吸收机制、胃肠道安全性筛查及中西药相互作用评价提供更具人源相关性的体外模型。

5 挑战与未来展望

尽管小肠类器官来源 2D 屏障模型在模拟人源肠上皮结构、提高药物吸收评价生理相关性方面展现出重要潜力,但其从实验室模型走向药物研发常规工具仍面临若干关键限制。当前挑战不仅来自模型构建流程本身的可重复性和标准化不足,也涉及细胞组成与组织微环境简化、肠道微生物互作难以稳定重建,以及与肝脏、免疫系统等其他器官功能单元耦合不足等问题。因此,本节将围绕标准化、细胞复杂性、微生物互作和多器官整合 4 个方面,系统分析该模型在药物吸收评价中的主要瓶颈,并展望其未来优化方向。

5.1 标准化困境与合成基质的开发

小肠类器官来源 2D 屏障模型走向药物研发应用的首要障碍并非单一操作步骤的不一致,而是从 3D 扩增、2D 成膜到药物通透性检测全过程中基质条件缺乏统一标准。目前,类器官培养仍高度依赖动物来源基质胶,如 Matrigel 或 BME。此类基质能够为肠干细胞扩增和类器官形成提供丰富的细胞外基质信号,但其成分复杂、批次差异明显,并含有多重未完全定义的生长因子和基质蛋白,可能影响细胞分化状态、屏障强度及药物扩散行为^[13]。因此,在药物吸收评价场景中,基质胶不应仅被视为“培养支撑材料”,而应被纳入模型标准化和质量控制体系中加以管理。

值得强调的是,未来的标准化方向并不一定是对所有培养阶段实行“一刀切”的完全无基质胶化,而应根据不同建模阶段采取分层替代策略。对于 3D 类器官扩增阶段,基质仍需提供支持干细胞存活、增殖和隐窝样结构形成的生物力学及黏附信号,因

此短期内可采用“批次筛选+关键成分定量+功能性放行标准”的方式降低 Matrigel/BME 带来的变异;中长期则应发展成分明确、力学性能可调、可降解且带有特定黏附肽段的合成水凝胶体系,如聚乙二醇(PEG)基水凝胶、层黏连蛋白功能片段修饰材料或 RGD 肽(H-甘氨酸-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-天冬酰胺-脯氨酸-OH)修饰材料,以逐步替代动物来源基质^[13]。对于 2D 屏障模型构建阶段,基质需求则不同,其核心目标不是维持 3D 形态,而是促进细胞均一贴附、极性建立和紧密连接成熟。因此,更适合采用薄层化、定义明确且可量化的包被体系,如胶原蛋白、纤连蛋白、层黏连蛋白片段或其组合,而不是继续使用厚层、成分复杂的胶状基质。

在药物吸收评价终点阶段,还应进一步关注基质层对药物扩散和转运数据解释的影响。Masete 等^[31]建立的无 BME 人十二指肠 2D 类器官单层模型表明,在不使用胶状基质包被的条件下,细胞仍可形成稳定屏障,并保留葡萄糖吸收、短链脂肪酸摄取和离子转运等十二指肠相关功能;同时,BME 包被可能增加亚上皮阻力并影响主动转运信号。这一结果提示,对于以 P_{app} 、外排比、示踪物通透性和转运功能为主要终点的实验,减少外源性胶状基质干扰可能比单纯提高细胞贴附更为重要。换言之,药物吸收模型的基质优化应从“能否支持细胞生长”进一步转向“是否影响药物扩散、屏障判读和功能外推”。

基于上述认识,小肠类器官来源 2D 屏障模型的基质标准化可按“三步走”路线推进:第一,在现有 Matrigel/BME 体系中建立最低限度质控标准,包括蛋白浓度、批号记录、凝胶厚度、包被量、残胶程度和 TEER 通透性背景值;第二,在 2D 屏障模型中优先推进薄层化和定义明确的 ECM 包被体系,并以细胞贴附率、单层闭合时间、TEER 平台值、Lucifer Yellow 或 FITC-dextran 通透性、P-gp/BCRP 功能和 CYP3A4 活性作为功能性放行指标;第三,在 3D 扩增阶段逐步引入合成水凝胶,并系统优化基质刚度、降解速率、黏附配体密度和生长因子结合能力,以实现从“经验性培养”向“可设计微环境”的转变。只有将基质材料、模型功能和药物吸收终点联合标准化,类器官来源 2D 屏障模型才可能真正成为可重复、可比较并适用于工业化筛选的体外评价工具。

5.2 细胞复杂性的提升：血管化与免疫共培养

当前小肠类器官来源 2D 屏障模型多以肠上皮细胞为主体，能够较好模拟药物跨上皮转运过程，但对药物吸收后的血管侧转运、免疫调控及炎症状态下屏障改变的反映仍较有限。未来模型复杂性的提升不应简单理解为“加入更多细胞类型”，而应围绕药物吸收评价中的关键科学问题进行模块化设计，即根据研究目的分阶段引入血管内皮、免疫细胞及神经/基质细胞等组成，并建立相应的功能性放行指标。

在第一阶段，可优先构建“上皮-内皮”双屏障界面。肠腔侧上皮负责药物摄取、外排和代谢，血管侧内皮则参与药物进入循环前的二次屏障调控。因此，单纯测定药物从顶端侧至基底侧的 P_{app} 并不能完全反映药物通过肠黏膜后进入血液侧的过程。芯片平台通过多通道结构和多孔膜设计，可在上皮层下方引入内皮细胞和流体灌流，从而更接近体内“肠腔-上皮-间质/基底膜-血管”界面。对于药物吸收评价而言，该类模型未来应重点比较上皮单层模型与上皮-内皮双屏障模型在 P_{app} 、外排比、内皮侧药物累积量、白蛋白/大分子泄漏和炎症因子诱导后屏障变化等方面的差异，而不仅停留在形态学共培养层面^[42]。

在第二阶段，可引入免疫细胞以模拟炎症或感染状态下的吸收改变。巨噬细胞、树突状细胞、T 细胞和中性粒细胞等并不只是“增加生理复杂性”的附加成分，而可能通过 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、干扰素 γ (IFN- γ) 等炎症因子调节紧密连接、黏液分泌、转运体表达和代谢酶活性，从而改变药物通透性和局部暴露水平。因此，免疫共培养模型更适合用于回答特定问题，例如炎症状态是否改变生物药剂学分类系统 (BCS) 边界药物的吸收、细胞因子是否抑制 CYP3A4 或 P-gp 功能、候选药物是否具有屏障保护或免疫毒性作用等。相应地，模型评价指标也应从单一 TEER 通透性扩展至细胞因子谱、免疫细胞活化状态、上皮损伤/修复标志物、转运体与代谢酶表达以及药物 P_{app} 变化等多维终点^[73]。

在第三阶段，可进一步构建“稳态-扰动-恢复”的动态评价框架。对于药物吸收研究而言，血管化和免疫共培养模型的价值不在于追求最大程度的复杂化，而在于能否重现临床相关的病理扰动及药物干预后的恢复过程。例如，可先建立稳定的上皮屏障基线，再加入内皮层形成血管侧界面，随

后通过 LPS、TNF- α 或病原体相关刺激诱导屏障损伤，最后评价候选药物对 TEER 恢复、旁路通透性降低、炎症因子下调和转运功能恢复的影响。

因此，本文认为小肠类器官来源 2D 屏障模型未来的细胞复杂性提升应遵循“按问题加模块、按功能设终点、按阶段验证”的原则。对于常规药物吸收初筛，纯上皮 Transwell 模型仍具有通量和标准化优势；对于炎症相关吸收改变、免疫毒性、屏障保护药物或复杂生物制剂评价，则可逐步引入内皮和免疫细胞；对于肠-肝轴、全身暴露预测或多器官毒性评价，则需进一步与血管灌流和多器官芯片系统整合。只有将细胞组成增加与明确的药物评价终点相匹配，模型复杂化才具有实际转化价值。

5.3 微生物互作研究的突破方向

肠道微生物群可通过直接代谢药物、调节胆汁酸和短链脂肪酸等代谢物组成、影响上皮屏障完整性及改变宿主转运体/代谢酶表达等途径，参与调控口服药物的吸收、疗效和毒性^[74]。然而，在小肠类器官来源 2D 屏障模型中稳定重建“药物-微生物-宿主”3 方互作仍面临明显挑战：一方面，多数肠道厌氧菌难以在传统静态培养体系中长期存活；另一方面，复杂菌群组成动态变化较快，容易造成模型批间差异和结果解释困难。因此，未来微生物互作研究的重点不仅是“能否把菌群加入模型”，而应转向建立可控、可追踪、可定量的药物-菌群-宿主互作评价体系。

本文认为，该方向可按“三阶段路线”推进。第一阶段可采用定义明确的单菌株或功能菌株组合，验证特定微生物代谢酶或代谢产物对药物稳定性、 P_{app} 、TEER、CYP3A4、P-gp 及炎症因子的影响。例如，可选择具有已知药物代谢能力的菌株，结合 LC-MS/MS 检测药物消耗和代谢产物生成，从而区分“微生物直接代谢药物”和“微生物通过宿主屏障间接影响吸收”2 类机制。第二阶段可构建低复杂度合成菌群，以短链脂肪酸、胆汁酸转化、黏液利用或炎症诱导等功能模块为基础，评价不同功能菌群对药物通透性、外排比和上皮损伤修复的影响。第三阶段则可引入患者来源粪菌样本，在芯片平台中结合氧梯度、流体剪切力和类蠕动机机械刺激，探索个体化菌群组成与药物吸收差异之间的关系。

芯片平台在该领域的价值在于能够通过微流控结构建立相对稳定的厌氧-好氧界面，使腔侧微生

物与需氧或兼性需氧的宿主上皮细胞在空间上分隔、功能上互作。Ballerini 等^[75]将人粪菌样本和类蠕虫刺激整合于 gut-on-a-chip 系统, 证明复杂菌群可在动态芯片环境中与宿主细胞发生互作, 并可用于预测黑色素瘤患者对免疫检查点抑制剂的响应。虽然该研究并非直接针对药物吸收评价, 但其提示患者来源菌群与宿主上皮反应可在芯片中进行功能性建模, 为未来开展个体化药物吸收和疗效预测提供了方法学启示。Valiei 等^[76]也指出, gut-on-a-chip 已发展出多种用于微生物与人肠道细胞共培养的设计, 包括氧梯度控制、黏液层维持、流体灌流和多腔室分隔等策略。

对于药物吸收研究而言, 微生物互作模型的评价终点应从单纯观察菌群存活扩展为多维定量指标。微生物侧应监测菌群组成、厌氧菌存活率、代谢物谱和药物代谢产物; 宿主侧应检测 TEER、Lucifer Yellow 或 FITC-dextran 通透性、紧密连接蛋白定位、黏液层完整性、炎症因子释放以及 CYP3A4、ABCB1/P-gp、ABCG2/BCRP 和 SLC 转运体表达或功能; 药物侧则应同步测定母药消耗、代谢物生成、 P_{app} 和外排比。只有将微生物组成变化、宿主屏障反应和药物处置参数整合分析, 才能真正阐明菌群对口服药物吸收的影响机制。

因此, 未来“药物-微生物-宿主”互作模型的发展应遵循由简到繁、由机制验证到个体化预测的路线: 定义菌株用于明确因果机制, 合成菌群用于提高可重复性和功能模块化评价, 患者来源菌群用于探索个体差异和临床外推。对于常规药物吸收初筛, 复杂菌群模型并非必要; 但对于易受菌群代谢影响的药物、抗生素联合用药、炎症性肠病相关用药以及免疫治疗辅助用药, 微生物整合型肠道芯片可能成为揭示疗效差异和不良反应风险的重要工具。

5.4 多器官芯片与人工智能的融合

单一小肠屏障模型能够评价药物跨上皮吸收、外排和局部代谢, 但难以反映口服药物吸收后的首过代谢、系统清除和器官间相互作用。因此, 多器官芯片在药物吸收评价中的价值不应仅理解为将肠道、肝脏、肾脏等模块进行物理串联, 而应围绕口服药物 ADME 过程建立最小充分耦合的定量评价体系。对于多数口服药物而言, 可优先构建“肠-肝”或“肠-肝-肾”轴模型: 肠道模块输出 P_{app} 、外排比、肠道代谢和屏障损伤指标, 肝脏模块输出内

在清除率、代谢物生成速率和肝毒性指标, 肾脏模块进一步评价代谢物清除和潜在肾毒性。该类模型尤其适用于首过代谢显著、活性代谢物参与疗效或毒性、以及肠道吸收与肝肾清除共同决定系统暴露的候选药物^[42,61]。

未来多器官芯片的发展重点应从“结构连接”转向“参数连接”。也就是说, 模型不仅需要在物理上实现连续灌流, 还应输出可与药理学模型衔接的定量参数, 包括肠道 P_{app} 、肠道外排比、肝脏代谢清除率、代谢物生成量、蛋白结合、流速、培养体积和器官间比例等。进一步地, 可将芯片实验数据输入生理药代动力学 (PBPK) 模型, 用于预测口服吸收分数、首过代谢比例、血药浓度-时间曲线以及特殊人群暴露差异。对于小肠类器官来源屏障模型而言, 这种“芯片-PBPK”耦合比单纯提高模型复杂度更具转化意义, 因为它能够将体外屏障功能数据转化为可用于人体暴露预测的药理学参数^[77]。

人工智能的作用也应从大数据分析细化为三个层面。第一, 在模型质量控制层面, 可采用卷积神经网络 (CNN)、U-Net 或 Mask R-CNN 等图像分割算法, 自动识别单层闭合程度、细胞脱落、气泡、污染、坏死区域和类器官/细胞形态异常; 同时结合异常检测算法, 对 TEER 突降、荧光示踪物泄漏或灌流压力异常进行实时预警。第二, 在动态功能建模层面, 可采用随机森林、XGBoost、支持向量机或高斯过程回归等机器学习方法, 整合 P_{app} 、TEER、Lucifer Yellow 通透性、CYP3A4 活性、P-gp 外排比和代谢物生成量等多维终点, 建立药物吸收或毒性风险预测模型; 对于连续成像、实时电阻和药物浓度-时间曲线等时间序列数据, 则可采用长短期记忆网络 (LSTM)、时间卷积网络 (TCN) 或 Transformer 模型提取动态响应特征。第三, 在临床外推层面, 可将患者来源类器官、临床基因型、疾病状态、共用药物和临床药代数据结合, 构建面向个体化给药的预测模型^[78-79]。

基于此, 本文认为小肠类器官来源屏障模型与多器官芯片及 AI 的融合可按“三步走”路线推进。第一步, 建立标准化单器官数据集, 以统一格式记录 P_{app} 、TEER、转运体功能、代谢酶活性、细胞图像和培养条件, 用于训练图像质控和实验批次判别模型。第二步, 构建“肠-肝”双器官芯片, 并将母药消耗、代谢物生成和肝毒性响应与 PBPK 模型耦

合,用于评价首过代谢显著或具有活性代谢物的候选药物。第三步,面向特殊临床场景进一步加入肾脏、免疫或微生物模块,并结合机器学习模型开展个体化风险分层。例如,对于 CYP3A4/P-gp 双重底物,可利用肠道 P_{app} 、P-gp 外排比和肝脏 CYP3A4 清除率预测口服暴露;对于窄治疗窗药物,可结合患者来源类器官和临床用药信息评估个体化吸收和毒性风险;对于肠炎、肠道菌群紊乱或肝肾功能异常患者,则可通过多器官芯片模拟疾病状态下的吸收-代谢-清除耦合改变。

因此,多器官芯片与 AI 融合的前景不在于简单追求平台复杂化或算法高级化,而在于形成“类器官屏障模型-多器官动态耦合-AI/PBPK 预测”的闭环体系。对于常规渗透性初筛,单一 Transwell 或肠道芯片仍具有成本和通量优势;而对于首过代谢强、系统暴露受多器官共同影响、存在明显个体差异或需要患者分层的药物,多器官芯片结合 AI 建模才更具有应用价值。

6 结语

从 3D 类器官到 2D 屏障模型的技术演进,标志着药物吸收评价正从“形态模拟”走向“功能重建”。这一转化突破了传统 3D 类器官“顶膜内翻”的结构局限,使极性正确、顶面可及的屏障模型得以建立,为药物吸收研究提供了更接近人体生理的实验平台。

当前,小肠类器官来源的 2D 屏障模型已跨越“能否构建”的探索阶段,进入“能解决什么实际问题”的应用验证期。它成功桥接了传统 2D 细胞系与复杂动物模型之间的鸿沟——相较于 Caco-2 细胞,其保留了更完整的细胞多样性、转运体表达谱和代谢酶活性;相较于动物模型,其提供了可规模化、可重复的人源化替代方案。在渗透性评价、转运体功能研究、首过代谢评估及毒性筛选等领域,该模型已展现出独特价值,其预测结果与临床数据的吻合度显著优于传统模型。在平台选择上,Transwell 与器官芯片各有定位、互补发展。Transwell 平台凭借其标准化和高通量优势,适用于早期药物筛选;芯片平台则通过引入流体剪切力和机械蠕动,为深入研究药物代谢、微生物互作及免疫调控提供了更仿生的微环境。二者共同构成了从初筛到机制验证的完整技术链条。

展望未来,随着合成基质的推广应用、多细胞体系的整合(血管内皮、免疫细胞)、微生物共培

养技术的成熟以及多器官芯片与人工智能的融合,类器官来源的屏障模型有望从单一吸收评价工具,演进为整合渗透、代谢、免疫、毒性于一体的综合性药物评价平台。这一平台不仅将推动新药研发的效率提升,更有望在个性化精准用药指导中发挥核心作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hua S S. Advances in oral drug delivery for regional targeting in the gastrointestinal tract-influence of physiological, pathophysiological and pharmaceutical factors [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 524.
- [2] Koziol M, Augustijns P, Berger C, et al. Challenges in permeability assessment for oral drug product development [J]. Pharmaceutics, 2023, 15(10): 2397.
- [3] Amidon G L, Lennernäs H, Shah V P, et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability [J]. Pharm Res, 1995, 12(3): 413-420.
- [4] 孟云, 徐宇航, 吴龙, 等. Caco-2 单细胞模型及其培养模型的应用进展 [J]. 中国药理学杂志, 2023, 58(14): 1271-1275.
Meng Y, Xu Y H, Wu L, et al. Progress in application of caco-2 single cell model and co-culture model [J]. Chin Pharm J, 2023, 58(14): 1271-1275.
- [5] Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, et al. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics [J]. Cell Biol Toxicol, 2005, 21(1): 1-26.
- [6] Zhang Y J, Huang S B, Zhong W G, et al. 3D organoids derived from the small intestine: An emerging tool for drug transport research [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(7): 1697-1707.
- [7] Michiba K, Watanabe K, Imaoka T, et al. Recent advances in the gastrointestinal complex *in vitro* model for ADME studies [J]. Pharmaceutics, 2023, 16(1): 37.
- [8] Sjögren E, Abrahamsson B, Augustijns P, et al. *In vivo* methods for drug absorption-comparative physiologies, model selection, correlations with *in vitro* methods (IVIVC), and applications for formulation/API/excipient characterization including food effects [J]. Eur J Pharm Sci, 2014, 57: 99-151.
- [9] Hope L, Bailey J. Breaking down the barriers to animal-free research [J]. Altern Lab Anim, 2025, 53(4): 215-231.
- [10] U.S. Food and Drug Administration. Roadmap to reducing

- animal testing in preclinical safety studies [R]. Silver Spring: U.S. Food and Drug Administration, 2025.
- [11] Grand View Research. Human organoids market (2025-2030) size, share & trends analysis report by product, by sources, by organ type, by application, by end use, by region, and segment forecasts [R]. San Francisco: Grand View Research, 2025.
- [12] Hofer M, Lutolf M P. Engineering organoids [J]. Nat Rev Mater, 2021, 6(5): 402-420.
- [13] Gjorevski N, Sachs N, Manfrin A, et al. Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture [J]. Nature, 2016, 539(7630): 560-564.
- [14] 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): 262-265.
- [15] Sato T, Stange D E, Ferrante M, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium [J]. Gastroenterology, 2011, 141(5): 1762-1772.
- [16] Flores E Y, Mithal A, Bawa P, et al. Human-induced pluripotent stem cell-derived gut organoids recapitulate regional specific genetic programs and a role for cAMP in lineage specification [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2025, 19(9): 101534.
- [17] Zachos N C, Kovbasnjuk O, Foulke-Abel J, et al. Human enteroids/colonoids and intestinal organoids functionally recapitulate normal intestinal physiology and pathophysiology [J]. J Biol Chem, 2016, 291(8): 3759-3766.
- [18] Spence J R, Mayhew C N, Rankin S A, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro* [J]. Nature, 2011, 470(7332): 105-109.
- [19] Clevers H. Shifting paradigms in tissue stem cell biology: Insights from the intestine [J]. Cell, 2026, 189(3): 706-724.
- [20] Kozuka K, He Y, Koo-McCoy S, et al. Development and characterization of a human and mouse intestinal epithelial cell monolayer platform [J]. Stem Cell Reports, 2017, 9(6): 1976-1990.
- [21] Co J Y, Margalef-Català M, Li X N, et al. Controlling epithelial polarity: A human enteroid model for host-pathogen interactions [J]. Cell Rep, 2019, 26(9): 2509-2520.e4.
- [22] Davoudi Z, Atherly T, Borcharding D C, et al. Study transportation of drugs within newly established murine colon organoid systems [J]. Adv Biol, 2023, 7(12): e2300103.
- [23] Shin W, Kim H J. 3D *in vitro* morphogenesis of human intestinal epithelium in a gut-on-a-chip or a hybrid chip with a cell culture insert [J]. Nat Protoc, 2022, 17(3): 910-939.
- [24] Iwao T, Matsunaga T. Development of intestinal organoids and microphysiological systems and their application to drug discovery [J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2025, 60: 101045.
- [25] Gill E, Muenchau Schoepp S, Simon S, et al. Application of a bioengineered intestinal epithelium for drug permeability and metabolism studies [J]. Lab Chip, 2025, 25(24): 6533-6549.
- [26] Felsenthal N, Vignjevic D M. Generation of intestinal epithelial monolayers from single-cell dissociated organoids [J]. Bio Protoc, 2025, 15(19): e5474.
- [27] Pleguezuelos-Manzano C, Puschhof J, van den Brink S, et al. Establishment and culture of human intestinal organoids derived from adult stem cells [J]. Curr Protoc Immunol, 2020, 130(1): e106.
- [28] Wang M, Yu H, Zhang T, et al. In-depth comparison of matrigel dissolving methods on proteomic profiling of organoids [J]. Mol Cell Proteomics, 2022, 21(1): 100181.
- [29] Tanaka K, Mochizuki T, Baba S, et al. Robust and reproducible human intestinal organoid-derived monolayer model for analyzing drug absorption [J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 11403.
- [30] Benz P, Plenge M, Wagner S, et al. Two-dimensional porcine intestinal organoids reflecting the physiological properties of native gut [J]. J Vis Exp, 2025(215): e67666.
- [31] Masete K V, Günzel D, Schulzke J D, et al. Matrix-free human 2D organoids recapitulate duodenal barrier and transport properties [J]. BMC Biol, 2025, 23(1): 2.
- [32] Plenge M, Schnepel N, Müsken M, et al. Development and characterization of a 2D porcine colonic organoid model for studying intestinal physiology and barrier function [J]. PLoS One, 2025, 20(5): e0312989.
- [33] Yamashita T, Inui T, Yokota J, et al. Monolayer platform using human biopsy-derived duodenal organoids for pharmaceutical research [J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2021, 22: 263-278.
- [34] Klein J A, Heidmann J D, Kiyota T, et al. The differentiation state of small intestinal organoid models influences prediction of drug-induced toxicity [J]. Front Cell Dev Biol, 2025, 13: 1508820.
- [35] Weiß F, Holthaus D, Kraft M, et al. Human duodenal organoid-derived monolayers serve as a suitable barrier model for duodenal tissue [J]. Ann N Y Acad Sci, 2022, 1515(1): 155-167.
- [36] Fey C, Truschel T, Nehlsen K, et al. Enhancing pre-clinical

- research with simplified intestinal cell line models [J]. J Tissue Eng, 2024, 15: 20417314241228949.
- [37] Donkers J M, van der Vaart J I, van de Steeg E. Gut-on-a-chip research for drug development: Implications of chip design on preclinical oral bioavailability or intestinal disease studies [J]. Biomimetics, 2023, 8(2): 226.
- [38] Kim H J, Li H, Collins J J, et al. Contributions of microbiome and mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human gut-on-a-chip [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(1): E7-E15.
- [39] Shin W, Hinojosa C D, Ingber D E, et al. Human intestinal morphogenesis controlled by transepithelial morphogen gradient and flow-dependent physical cues in a microengineered gut-on-a-chip [J]. iScience, 2019, 15: 391-406.
- [40] Mennella R, Sibilio S, Urciuolo F, et al. Flow-induced mechano-modulation of intestinal permeability on chip [J]. Mater Today Bio, 2025, 33: 101951.
- [41] Lino M, Persson H, Paknahad M, et al. A pumpless microfluidic co-culture system to model the effects of shear flow on biological barriers [J]. Lab Chip, 2025, 25(6): 1489-1501.
- [42] Nasiri R, Madadelahi M, Nikmaneshi M R, et al. Engineering biomimetic tissue barrier models on chips: From design and fabrication to applications in disease modeling and drug screening [J]. Biomaterials, 2026, 327: 123739.
- [43] Galvan A, Guidorizzi E, Carton F, et al. *In vitro* and *ex vivo* models to study molecular trafficking across the human intestinal barrier [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(21): 10535.
- [44] Henry O Y F, Villenave R, Cronce M J, et al. Organs-on-chips with integrated electrodes for trans-epithelial electrical resistance (TEER) measurements of human epithelial barrier function [J]. Lab Chip, 2017, 17(13): 2264-2271.
- [45] Holzreuter M A, Segerink L I. Innovative electrode and chip designs for transendothelial electrical resistance measurements in organs-on-chips [J]. Lab Chip, 2024, 24(5): 1121-1134.
- [46] Wang H, Li X Y, Shi P C, et al. Establishment and evaluation of on-chip intestinal barrier biosystems based on microfluidic techniques [J]. Mater Today Bio, 2024, 26: 101079.
- [47] Bodenstein D F, Siebiger G, Zhao Y M, et al. Bridging the gap between *in vitro* and *in vivo* models: A way forward to clinical translation of mitochondrial transplantation in acute disease states [J]. Stem Cell Res Ther, 2024, 15(1): 157.
- [48] Moyer H L, Vergara L, Stephan C, et al. Human small intestinal tissue models to assess barrier permeability: Comparative analysis of caco-2 cells, jejunal and duodenal enteroid-derived cells, and EpiIntestinal (TM) tissues in membrane-based cultures with and without flow [J]. Bioengineering, 2025, 12(8): 809.
- [49] Gleeson J P, Zhang S Y, Subelzu N, et al. Head-to-head comparison of caco-2 transwell and gut-on-a-chip models for assessing oral peptide formulations [J]. Mol Pharmaceutics, 2024, 21(8): 3880-3888.
- [50] Moerkens R, Mooiweer J, Smits E, et al. Gene expression profiling reveals enhanced nutrient and drug metabolism and maturation of hiPSC-derived intestine-on-chip relative to organoids and Transwells [J]. Stem Cell Rep, 2025, 20(12): 102715.
- [51] de Souza Teixeira L, Vila Chagas T, Alonso A, et al. Biomimetic artificial membrane permeability assay over franz cell apparatus using BCS model drugs [J]. Pharmaceutics, 2020, 12(10): 988.
- [52] Hudson C S, Cheong J, Yu J, et al. Comparing the altis RepliGut organoid system to MDCK monolayers in predicting the oral absorption of lenalidomide [J]. Pharmaceutics, 2025, 17(9): 1140.
- [53] Ayeahunie S, Landry T, Stevens Z, et al. Human primary cell-based organotypic microtissues for modeling small intestinal drug absorption [J]. Pharm Res, 2018, 35(4): 72.
- [54] Inui T, Uraya Y, Yokota J, et al. Functional intestinal monolayers from organoids derived from human iPS cells for drug discovery research [J]. Stem Cell Res Ther, 2024, 15(1): 57.
- [55] Mukkavilli R, Jadhav G, Vangala S. Evaluation of drug transport in MDCKII-wild type, MDCKII-MDR1, MDCKII-BCRP and caco-2 cell lines [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2017, 18(14): 1151-1158.
- [56] Kasendra M, Luc R, Yin J Y, et al. Duodenum Intestine-Chip for preclinical drug assessment in a human relevant model [J]. eLife, 2020, 9: e50135.
- [57] Zietek T, Rath E, Haller D, et al. Intestinal organoids for assessing nutrient transport, sensing and incretin secretion [J]. Sci Rep, 2015, 5: 16831.
- [58] Zietek T, Boomgaarden W A D, Rath E. Drug screening, oral bioavailability and regulatory aspects: A need for human organoids [J]. Pharmaceutics, 2021, 13(8): 1280.
- [59] Wilkinson G R. Drug metabolism and variability among patients in drug response [J]. N Engl J Med, 2005, 352(21): 2211-2221.
- [60] Carius P, Weinelt F A, Cantow C, et al. Addressing the

- ADME challenges of compound loss in a PDMS-based gut-on-chip microphysiological system [J]. *Pharmaceutics*, 2024, 16(3): 296.
- [61] Chai D N, Wang Q, Yong Q, et al. Multidimensional development of gut-on-a-chip technology: From fabrication processes, models, gut microbiome to gut-organ axis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2026, 271: 117322.
- [62] Guo Y Q, Li Z Y, Su W T, et al. A biomimetic human gut-on-a-chip for modeling drug metabolism in intestine [J]. *Artif Organs*, 2018, 42(12): 1196-1205.
- [63] Wang M Y, Sasaki Y, Sakagami R, et al. Perfluoropolyether-based gut-liver-on-a-chip for the evaluation of first-pass metabolism and oral bioavailability of drugs [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2024, 10(7): 4635-4644.
- [64] Hoffmann S, Hewitt P, Koscielski I, et al. Validation of an MPS-based intestinal cell culture model for the evaluation of drug-induced toxicity [J]. *Front Drug Discov*, 2025, 4: 1459424.
- [65] Pike C M, Levi J A, Boone L A, et al. High-throughput assay for predicting diarrhea risk using a 2D human intestinal stem cell-derived model [J]. *Toxicol Vitro*, 2025, 106: 106040.
- [66] Bein A, Fadel C W, Swenor B, et al. Nutritional deficiency in an intestine-on-a-chip recapitulates injury hallmarks associated with environmental enteric dysfunction [J]. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6(11): 1236-1247.
- [67] Ogulur I, Pat Y, Aydin T, et al. Gut epithelial barrier damage caused by dishwasher detergents and rinse aids [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2023, 151(2): 469-484.
- [68] Han J L, Wang Y S, Ding J M, et al. Gut-on-a-chip reveals enhanced peristalsis reduces nanoplastic-induced inflammation [J]. *Small*, 2025, 21(3): e2408208.
- [69] Yang J Y, Jiang Y, Li M X, et al. Organoid, organ-on-a-chip and traditional Chinese medicine [J]. *Chin Med*, 2025, 20(1): 22.
- [70] Han Y C, Li M T, Chen T, et al. Berberine alleviates intestinal inflammation by disrupting pathological macrophage-epithelial crosstalk in macrophage-organoid co-culture model [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(20): 10161.
- [71] Ishiguro M, Takahara M, Takaki A, et al. Berberine prevents NSAID-induced small intestinal injury by protecting intestinal barrier and inhibiting inflammasome-associated activation [J]. *Dig Dis Sci*, 2025, 70(12): 4140-4151.
- [72] Zhao B, Ye J, Zhao W J, et al. 6-shogaol derived from ginger inhibits intestinal crypt stem cell differentiation and contributes to irritable bowel syndrome risk [J]. *Research*, 2024, 7: 524.
- [73] Papp D, Korcsmaros T, Hautefort I. Revolutionizing immune research with organoid-based co-culture and chip systems [J]. *Clin Exp Immunol*, 2024, 218(1): 40-54.
- [74] 王尧, 陈果, 张仕杰, 等. 中药通过调节肠道微生物-肠免疫轴治疗溃疡性结肠炎研究进展 [J]. *中草药*, 2024, 55(22): 7857-7869.
- Wang Y, Chen G, Zhang S J, et al. Research progress on traditional Chinese medicine in treatment of ulcerative colitis by regulating intestinal microbiota-gut immune axis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(22): 7857-7869.
- [75] Ballerini M, Galiè S, Tyagi P, et al. A gut-on-a-chip incorporating human faecal samples and peristalsis predicts responses to immune checkpoint inhibitors for melanoma [J]. *Nat Biomed Eng*, 2025, 9(6): 967-984.
- [76] Valiei A, Aminian-Dehkordi J, Mofrad M R K. Gut-on-a-chip models for dissecting the gut microbiology and physiology [J]. *APL Bioeng*, 2023, 7(1): 011502.
- [77] Yang Y, Chen Y, Wang L, et al. PBPK modeling on organs-on-chips: An overview of recent advancements [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 900481.
- [78] Zhou Z L, Cong L L, Cong X L. Patient-derived organoids in precision medicine: Drug screening, organoid-on-a-chip and living organoid biobank [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 762184.
- [79] Deng S W, Li C F, Cao J X, et al. Organ-on-a-chip meets artificial intelligence in drug evaluation [J]. *Theranostics*, 2023, 13(13): 4526-4558.

[责任编辑 兰新新]