

微流控肝、肾芯片在中药毒理研究中的应用

林嘉伟, 杨依霏, 刘婷*, 朱晓新*
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100029)

[摘要] 微流控肝、肾芯片是近年来进行新药研发、药效毒理研究和机制探索、疾病模型构建的优选模型载体。在美国食品药品监督管理局允许当动物疾病模型难以构建时,用体外模型数据代替动物模型数据进行新药申报的大背景下,微流控芯片因为具有高通量、能高度仿生生命体特征、可方便进行重复给药的正常或病理状态下的药物毒性评价且允许对培养物培养过程进行实时诱导、监测过程数据实时采集分析等优点而得到广泛的关注。在毒理学研究中,肝、肾芯片可以通过结合不同物种来源的2D单培养和共培养、3D培养、球状体/类器官细胞、精密切割肝、肾切片、永生化细胞系或夹心培养细胞系等培养物,构建适合不同物质药效毒理学检测的体外模型。该模型最大化模拟或保留肝脏和肾脏的脏器功能和体内微环境,包括特定的生理组织结构、多细胞相互作用/串扰、多器官相互协作/反馈等,以得到与体内实验数据相近或相同的结果,减少了不同种属之间的差异;同时大大减少实验动物的使用,降低了成本。微流控技术提供的微流体不仅能为内容物培养提供必要的剪切力微环境,还能解决目前由于肝、肾芯片培养过程中组织供氧不足、营养物质的缺失、代谢物堆积,导致的细胞凋亡甚至组织坏死纤维化,难以长期维持结构和功能等问题。该文旨在对微流控技术结合肝脏芯片与肾脏芯片在中药毒理研究中的应用进行综述,通过梳理微流控技术、肝脏芯片、肾脏芯片的发展历程及微流控肝、肾芯片在中药毒理研究中的应用实例,结合中药给药特点探讨其在中药毒理研究领域的应用优势及未来发展方向。

[关键词] 微流控肝芯片; 微流控肾芯片; 中药毒理学; 精密器官切片; 3D培养; 类器官

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)14-0272-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230407

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/11.3495.R.20230213.1109.001.html>

[网络出版日期] 2023-02-13 14:12:43

Application of Microfluidic Liver and Kidney Chips in Toxicology Research of Chinese Medicine

LIN Jiawei, YANG Yifei, LIU Ting*, ZHU Xiaoxin*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences,
Beijing 100029, China)

[Abstract] Microfluidic liver and kidney chips have become preferred model carriers in recent years for new drug development, pharmacological and toxicological research, mechanism exploration, and disease model construction. In the context of the USA. Food and Drug Administration allowing the use of *in vitro* model data as a substitute for animal model data in new drug applications when animal disease models are difficult to construct, microfluidic chips have received widespread attention due to their high throughput, ability to highly mimic biological characteristics of living organisms, convenient evaluation of drug toxicity in normal or pathological states with repeated dosing, real-time induction and monitoring of culture processes, and real-time data acquisition and analysis. In toxicology research, liver and kidney chips can construct *in vitro* models

[收稿日期] 2022-10-14

[基金项目] 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A04804);国家自然科学基金项目(82104550)

[第一作者] 林嘉伟, 硕士, 从事中药毒理研究, Tel: 010-84252832-2231, E-mail: Jwlin730@163.com

[通信作者] * 朱晓新, 博士, 研究员, 从事药理学研究, Tel: 010-64093296, E-mail: xxzhu@icmm.ac.cn;

* 刘婷, 硕士, 研究员, 从事毒理学研究, Tel: 010-84252832-2209, E-mail: tliu@icmm.ac.cn

suitable for the pharmacological and toxicological detection of different substances by combining 2D monocultures and co-cultures from different species sources, 3D cultures, spheroids/organoid cells, precision-cut liver and kidney slices, immortalized cell lines, or sandwich-cultured cell lines. This model maximally simulates or retains the organ function and *in vivo* microenvironment of the liver and kidney, including specific physiological tissue structures, multicellular interactions/crosstalk, and multi-organ coordination/feedback, to obtain results similar to or the same as *in vivo* experimental data, reducing interspecies differences. At the same time, it greatly reduces the use of experimental animals and lowers costs. Microfluidic technology provides necessary shear force microenvironments for the cultivation of contents and solves problems encountered in the cultivation process of liver and kidney chips, such as insufficient tissue oxygen supply, nutrient deficiencies, and accumulation of metabolites, leading to cell apoptosis and even tissue necrosis fibrosis, which make it difficult to maintain long-term structure and function. This article reviewed the application of microfluidic technology combined with liver and kidney chips in Chinese medicine toxicology research. By summarizing the development of microfluidic technology, liver chips, kidney chips, and providing application examples of microfluidic liver and kidney chips in Chinese medicine toxicology research, combined with the characteristics of Chinese medicine administration, the article explored the advantages and future development directions of their application in the field of Chinese medicine toxicology research.

[Keywords] microfluidic liver chip; microfluidic kidney chip; toxicology of Chinese medicine; precision-cut organ slice; 3D culture; organoids

现有数据表明,中药出口已超过175个国家和地区^[1]。中药的广泛应用也导致近年来以药源性肝、肾损伤为代表的药物不良反应/事件成为不可忽视的问题。有证据表明,中药药源性肝损伤(HILI)占临床全部药物损伤的2.6%~4.8%,在全部药源性肝损伤(DILI)中的构成比约为20%^[2];在《中国药品不良反应信息通报》公布的162个药物品种中,中药药源性肾损伤(HIKI)在中药引发的不良反应中,占比61.5%^[3]。因此,加强临床前及已上市中药安全性评价研究,正确认识中药不良反应及其机制,为中药临床安全使用提供科学依据显得尤为重要。

人源细胞的体外培养和整体动物模型是中药毒理研究的常见方式。原代细胞在体外难以长时间维持生命力和表型,无法满足中药作用缓慢带来的长时间、多次给药特性的研究需求,而永生化细胞虽能不断生长繁殖,但其在培养过程中会产生表型偏移,导致实验结果出现偏差。整体动物模型存在价格昂贵、通量低、时间长、敏感性和特异性较差等问题。故而中药研究急需一种能最大程度保留生理相似度、高通量、经济、灵敏、便于动态监测、能长时间培养、多次重复给药的符合中药作用特点的模型载体。微流控技术因其仿生、灵敏、准确、可长期培养、易动态监测等特点,已被越来越多的应用于中药药理、毒理等研究领域。

微流控系统作为微量分析技术由方肇伦院士

于2000年首次引入中国^[4]。经过几十年的发展,微流控芯片可用于模拟体内复杂微环境,实现细胞或组织培养微环境的精确调控,且利用光学显微镜、流动压力传感器、电泳仪、色谱等仪器的相互组合,能对芯片内细胞或组织生理特征和微量基础代谢物质的转变进行实时监控。将不同类型细胞以特定方式排布的类器官芯片或对动物部分组织进行培养的器官芯片,通过微流控技术串联,可实现多器官共同作用和重复给药,模拟药物在体内正常吸收、分布、代谢、排泄过程^[5]。下面就微流控的发展历程及其肝、肾芯片在毒理学中的应用进行详述。

1 微流控发展史

1990年MANZ等^[6]提出“全化学分析系统(TAS)”的概念,并用理论推导证实结合现代传感器与基于流动注射分析、色谱分析和电泳分析于一体的全自动模块化分析系统的可行性。次年MANZ等^[7]将全化学分析系统结合硅晶光刻技术进一步讨论了该系统的可用性,为后续微流控芯片微加工奠定了雏形。

2000年MCDONALD等^[8]发表关于微流控新材料——聚二甲基硅氧烷(PDMS)。这种材料坚固,便宜,生物相容性好,高透气性,可采用相对简单的软刻蚀加工方法而不需要洁净室等苛刻加工环境。2001年,微流控芯片领域的主流刊物——*Lab on a Chip*的成功创刊,吸引了越来越多的学者

关注这个方向的发展。2002年 THORSEN 等^[9]在 *Science* 上发表“微流控大规模集成”式芯片的文章。类似于电子芯片,利用 PDMS 材质制备包含 3 574 个气动微阀分隔而出 1 000 个小室的集群式芯片,阀门开关视为 1 或 0 通过计算机定位控制每一个阀门,复杂混合样品在芯片内通过阀门开关、检测器检测,不断将样品细分纯化、并流混合、储存实现真正的自动的全化学分析系统。此后在 2003 年微流控芯片更是被 *Forbes* 杂志评为“未来影响人类最深的 15 件发明之一”。

2005 年 *Nature* 杂志针对 Shuler 团队,自 2000 年以来试图将体细胞导入芯片中进行培养,并成功将来自大鼠大脑、心脏和肝脏的细胞放在不同的沟槽中,通过微小的流体通道连接起来,以模拟相应器官功能的工作做了独家专访^[10]。紧接着 2006 年 7 月 *Nature* 更是连续刊载 6 篇关于微流控芯片的系列文章,包括芯片上的单分子测量、细胞培养、设计制作、工业趋势、监测设备、化学分离与合成各个方向^[11-12]。

2 微流控肝脏芯片

肝脏承担着分泌胆汁、储藏糖原,调节蛋白质、脂肪和碳水化合物的新陈代谢、造血和凝血作用、代谢内源性以及外来的毒性物质等重要功能,是人体最重要的解毒器官。自 1970 年 HepG2 细胞(人肝癌细胞)开始应用于临床前毒性评价,在过去 60 年里,整体动物给药和肝细胞的体外培养,一直是评估新药安全性、开展药理研究的主要手段^[13]。肝细胞体外培养方式多为以细胞外基质(ECM)包被原代肝细胞、永生化肝细胞、肝癌细胞或多能诱导干细胞在孔板中静态培养。但在该技术使用过程中,原代肝细胞、多能诱导干细胞在培养过程中相关功能会逐渐丧失、表型难以维系,永生化细胞和肝癌细胞来源于单独个人,对不同药物敏感度无法体现人类整体内的个体差异,且与人体正常肝细胞表型存在一定差距等问题逐渐被人们所发现^[14]。现今整体动物给药仍作为临床前药物安全性评价的“金标准”。

2.1 肝细胞芯片 肝脏在受到损害时,会通过激活一系列分子信号及通路完成自调控,以减少对正常生理功能造成的影响。这种自调控的体外重现被认为是评价药物肝脏毒性体外模型的重要指标。虽然参与自调控的精确分子信号及途径尚不完全清晰,难以在体外通过人工复制、调控肝脏在体内的完整生理代谢过程,但肝组织中多细胞共存可依

靠细胞间自分泌及旁分泌的调控途径,使得体外培养的肝组织相比于单独培养的肝组织模型,更接近整体动物肝脏对受试物产生的反应,由此多细胞共存的三维培养肝细胞芯片越来越得到更多的关注。三维培养系统,是 MOSCONA^[15] 在 1961 年开发的将胚胎中多种类型原代细胞悬浮分散后,分别进行空间再重构共培养的技术。后来由 SUTHERLAND 等^[16]及其合作者 DURAND^[17]先后于 1971 年和 1976 年将此种方法应用于肿瘤细胞球状体的构建。目前常用的细胞 3D 类球体形成的方式主要分为有支架和无支架两种:包括无支架的液体涂覆法(Lot)^[18-19]和悬滴法^[20],有支架的天然支架培养(藻酸盐、基质胶、胶原、丝素蛋白、透明质酸等)及合成支架培养聚乳酸(PLA)、聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)、纳米粘土聚合物等^[21]。ZHAO 等^[22]利用悬滴法原理,将含有一定数量的 HepG2 细胞悬滴液黏附在 PDMS 芯片表面形成肝脏类球体,并在其培养 3 d 后添加阿霉素溶液,通过测定类球体活力证实其在毒理评价中的适用性。JIA 等^[23]将海藻酸钠混合人肝细胞 C3A 和人内皮细胞 EA.hy926(3:1),注入芯片通道内形成肝板类似物,并通过对其代谢、合成能力和 mRNA 表达水平的评估,证明了该模型可用于开展肝脏体外模型的相关研究。但无论是有支架还是无支架,随着时间推移由于缺少血管等组织以及细胞不断增殖,内层细胞得到的物质交换将越来越匮乏,最终走向死亡。如 COLTMAN 等^[24]培养的 HepG2/C3A 球状体类器官于第 7 天左右直径趋于稳定,等到培养至 21 d 时,球状体直径已经大于第 7 天的 2 倍,通过染色观察发现球核内部细胞出现群聚性、大面积死亡。而使用微流控、3D 打印等技术构建的功能化肝脏类器官,却能很好的解决这一痛点^[25]。

2.2 肝脏类器官芯片 2002 年 Griffith 实验室第一次制造了真正意义上的 3D 培养肿瘤细胞球状体的微流控芯片^[26]。通过在硅晶片上刻蚀通孔及可供培养液流动的微通道,以 PE 薄膜作为支架在每个通孔中加入肝原代细胞和鼻咽癌细胞 NPC(19:1)组成的球状体类器官进行微流控灌注培养。通过配合双光子显微镜对组织结构进行原位成像,可见胆管及血管样结构,显示出良好的糖原储存能力^[27]。

3D 生物打印技术能将生物材料(水凝胶、纤维蛋白、海藻酸钠等)、生物化学物质(如生长和分化因子)、细胞等材料,在计算机辅助下按照设定好的结构,组装出含有模拟器官精细结构的活组织^[28]。

清华大学 WANG 等^[29]使用快速成型的挤压生物打印技术,以肝细胞和明胶混合物作为材料,打印30多层可持续培养2个月的网状肝脏类器官,但在其培养过程中,肝细胞表型及生命力迅速丧失,培养前2周,即能明显观测到肝细胞损伤的生物标志物肌酐(Cr)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)的分泌量处于高位,而其他体现肝脏合成功能的物质如白蛋白(ALB)、尿素(Ur)、葡萄糖(Glu)、和甘油三酯(TG)等在2个月培养期间始终处于低浓度状态。MA 等^[30]采用3D打印技术,用水凝胶和多能干细胞衍生的肝祖细胞(hiPSC-HPCs)、人脐静脉内皮细胞(HUVECS)、脂肪来源的干细胞(ADSCs),仿照肝小叶结构,构建多个六边形相互组合联通的肝脏类器官。该技术能在类器官培养7 d后,仍保持65%的肝细胞存活率,白蛋白、尿素在3D培养条件下10~15 d分泌量持续上升且处于相对高位,20 d仍能被明显检测。且E-钙黏蛋白的发现,证明了该类器官拥有细胞重组,形成血管、小胆管的潜力。如果能引导肝祖细胞的迅速分化,形成完整的肝脏微结构,体外肝脏培养技术将会得到新的突破。LI 等^[31]并非采用一次成型的3D生物打印技术,而是先将人肝癌细胞系SMMC-7721和人脐静脉内皮细胞分别打印成细胞簇,再将其与生物墨水混合导入早已浇筑好的PDMS材质的芯片中,进行3D或微流控培养。在美妥珠单抗的药效学试验中,微流控组对药物浓度表现出更高的敏感性,与动物实验结果相一致。

2.3 肝脏器官芯片 精密肝切片(PCLS)是通过震荡切片机从肝脏中分离出来的组织薄片。PCLS保留了肝脏的实质细胞、非实质细胞[肝星状细胞、肝巨噬细胞(Kupffer)等]、小胆管、肝小叶中央静脉、肝窦周狄氏腔(Disse腔)等,所有细胞类型及完整结构,使得其失去代谢能力的速度比一般原代细胞体外培养要慢,更有利于体外培养^[32-33]。

1990年KRUMDIECK 等^[34]首次发现震荡切片机可以快速生产极薄的组织切片。1985年由SMITH 等^[35]首次应用于构建毒性实验的体外肝脏模型。受限于肝切片培养需要及时供给大量营养物质,以及肝脏受损后48 h内激活纤维化进程,肝切片的相关药理、毒理实验开展时间一般只持续72 h。DE GRAAF 等^[36]发现在95%的高压氧气以及90 r·min⁻¹振摇的培养环境下肝切片的培养时间可以延长至96 h。WU 等^[37]在Graaf的基础上发现从原来浸没于培养液,改为竖向插入式,一半暴露

于空气,一半没入培养液的方式培养,肝切片培养时间能延长至7 d。PAISH 等^[38]设计出相邻培养孔互相联通的生物反应器,当振摇培养液时,相邻孔间形成正弦交换液流。此生物反应器能将肝切片的正常功能维持在6 d左右。

微流控技术结合高透气性PDMS材料制备的微流控芯片恰好能为培养PCLS提供充足的氧气、营养物质交换,源源不断的剪切力刺激及代谢废物清除等必要条件。VAN MIDWOUD 等^[39]在PDMS材质的微流控芯片中培养肝切片,并用7-乙氧基香豆素(7-EC)测试其代谢水平,用乳酸脱氢酶(LDH)的泄漏量的测定,评价肝切片24 h内的活力。与孔板静态培养的肝切片的实验结果相对比,前3 h内,静态和微流控总体代谢率相等,3 h后由于微流控肝切片存活细胞较多,静态培养肝切片代谢能力渐渐低于微流控肝切片。随后VAN MIDWOUD 等^[40]尝试将肠切片与肝切片串联,探究肝肠循环对药物代谢的影响,除了用7-乙氧基香豆素(7-EC)、7-羟基香豆素(7-HC)和利多卡因测定肝切片和肠切片的代谢能力,还用初级胆汁酸,鹅去氧胆酸(CDCA)的肝肠循环调控机制来证实肝切片和肠切片的相互作用,结果表明肝切片和肠切片的活性及功能分别可保持24 h和3 h,肠芯片分泌的成纤维细胞生长因子15(FGF15)使得肝脏中CYP7A1表达量比肝切片单独培养时更低。本课题组的试验证实,采用微流控技术,以PCLS为受试载体,可建立一种用于药源性胆汁淤积型肝损伤评价的PCLS培养模型,经与培养于微流控体系的单一细胞和非微流控体系的PCLS做对比,PCLS在微流控培养体系下,对受试物引起的肝损伤更为敏感和准确,且培养时间可延长至5 d^[41]。

3 微流控肾脏芯片

肾单位的单个组成部分,包括肾小球、近端肾小管和远端肾小管/髓样收集管,器官芯片技术已经成功实现对肾脏进行模拟^[42]。微流控技术能为肾芯片提供与体内肾血流和过滤之后产生的尿液流相似的液体流动环境。

3.1 肾细胞芯片 肾芯片的3D培养大致可分为两种类型,一种是基于PMDS、聚碳酸酯(PC)等聚合材料制作的隔离屏障模拟肾小球微膜,给细胞提供支持和隔离;第二种是利用水凝胶、剔除动物来源细胞的ECM或类似水凝胶的生物材料,对细胞进行包埋^[43]。WATERS 等^[44]将肾小球内皮细胞(GEC)、系膜细胞(MC)和原代足细胞,培养成3种细胞混合

的肾小球样模型。PETROSYAN等^[45]用胶原蛋白作为细胞外基质,在胶原蛋白层上侧通道底部种植人肾小球内皮细胞,下侧通道顶部种植人足细胞,以此模拟肾小球过滤结构。这种芯片构造,允许细胞间的相互串扰,从而用于与细胞串扰相关的病症模型(如糖尿病肾病DKD)的研究。但其通道内的流动相并非单向流动的,而是通过振摇双向流动,这一点与实际肾脏中液体单向运转的情况不符。

而开发与体内肾脏体液流动状态相接近的微流控肾芯片可追溯到2001年。ESSIG等^[46]从C57Bl/6小鼠中分离了近端小管细胞与LLC-PK1猪肾小管上皮细胞系进行对比,在两片载玻片(76 mm×26 mm)平行组成的芯片通道中通入层流流动相(1 mL·min⁻¹),探究肾小管血流对肾小管病变的影响。后来在2007年,BAUDOIN等^[47]开发一款由功能性肾小管活细胞微室组成并通过微流体网络相互连接的微流控芯片。该芯片中最大可容纳细胞数达到10⁶个/cm²,是同等条件下静态培养允许的最大细胞数的2倍,在谷氨酰胺的代谢测试中,该芯片亦表现出良好的代谢能力,此外该芯片还利用葡萄糖消耗量作为指标,氯化铵(5 mm和10 mm)作为受试药物并给药72 h,证实其在药物毒性评价中的应用。

3.2 肾脏类器官芯片 类器官芯片利用支架将多种类细胞按照一定的空间排布,共同作用模拟器官正常生理功能。TUFFIN等^[48]用纤维蛋白水凝胶在电纺聚乙醇酸(PGA)制备含有PGA超细纤维(14.5±2) μm和纤维蛋白凝胶纳米纤维(0.14±0.09) μm的复合双峰支架,从而模拟毛细血管网络,为永生代人足细胞和肾小球内皮细胞的黏附增殖提供3D环境,该方法灌注培养能够长达30 d^[49]。WEINBERG等^[50]将计算机模型与微流控肾芯片相结合,除了复制肾小球,近端小管和髓袢结构外,还使微流体流动速度和溶质传递速率与人类肾单位中血流流动和溶质传递特性相匹配。2010年JANG等^[51]首次使用多孔膜(Ø=0.4 μm)作为支架,模拟肾集合管。将原代大鼠内髓质收集管细胞(IMCD)置于多孔膜上施加1 dyn·cm⁻²的流体剪切应力灌注培养5 h,测定细胞活性、连接紧密程度、丝状肌动蛋白(F-肌动蛋白)、E-钙黏蛋白、抗水通道蛋白2和钠钾泵等与重吸收相关的功能指标。MUSAH等^[52]设计具有上下2个平行通道且中间用多孔柔性PDMS膜及纤连蛋白分隔而成的微流控芯片。在上层通道

中种植由多能干细胞(HIPS)诱导分化的足细胞,下层是原代人肾小球内皮细胞,微流体自下而上过滤,模拟尿液生成的过程。该芯片还用菊粉和白蛋白的过滤差异值计算清除率,以验证模型的滤过功能;暴露于不同剂量的阿霉素观察给药后足细胞损伤程度,证实此模型可作为药物肾毒性研究平台。

3D打印技术可以将细胞和生物材料按照特定的方式排列组合,解决构建类器官芯片时细胞分布不均匀,空间结构不统一等问题,从而制备出仿生性更强的肾脏类器官芯片。如HOMAN等^[53]使用纤维蛋白原、明胶和两种酶(凝血酶和转谷氨酰胺酶)组成的生物墨水,将近端小管上皮细胞(PTEC)模仿人肾近端小管结构进行3D打印,并且在PDMS芯片中灌注培养65 d,结果显示,近端小管上皮细胞形成的上皮屏障暴露于不同浓度的环孢菌素A时,上皮屏障的损伤程度呈现出剂量依赖性,显示出该芯片用于毒性研究的可行性。SINGH等^[54]从猪肾脏中提取含有完整的细胞外基质成分及其生化因子的生物墨水,将自制生物墨水混合肾近端肾小管上皮细胞(RPTECs)和HUVECS细胞,挤压打印成具有一定硬度的血管、肾小管和肾小球微血管类似物并整合至微流控芯片中培养。值得注意的是SINGH等设计的肾芯片所用的天然生物墨水,是从猪肾脏中直接提取的总蛋白,而非类似于Homan用明胶等成分配置的人工生物墨水。天然生物墨水被发现具有一定的抗纤维化能力及良好的生物相容性。但其制备流程复杂,且如果将人肾脏用于提取生物墨水,用于制备人肾脏模拟物的话将存在伦理等问题。而猪肾脏提取生物墨水能否代替人肾脏生物墨水还有待研究。值得注意的是3D打印技术自身存在一定的局限性,如使用挤压打印的方式,细胞遭受的机械应力和高温,或激光打印时的高能射线照射,都会对细胞造成一定损伤,影响最终3D打印芯片的类器官活力及功能^[55-56]。

3.3 肾脏器官芯片 目前肾切片主要应用于急性肾损伤模型、肾毒性药物研究,或者利用组织切片在损伤情况下自发纤维化激活的特性,进行肾纤维化相关的研究^[57-58]。如2010年KNOUZY等^[59]和2013年BAVEREL等^[60]将肾切片(5 mm×250 μm)置于95% O₂、37 °C水浴的培养基摇床上振动培养4 h和24 h,探究肾切片短期和长期暴露于肾毒性药物氯乙醛、氯化钴、丙戊酸盐的影响。JENSEN等^[61]利用肾切片纤维化模型评价EP₂受体激动剂对肾纤维化进程的干预。肾脏尤其是肾脏中的近曲小管

对缺血尤为敏感,缺血后的肾脏不同血管的收缩和舒张介质失衡,导致进一步的内皮等细胞受损^[62]。故而肾切片在体外培养的细胞损伤及功能丢失速度较快。RUEGG等^[63]开发了一款肾切片培养系统,该培养系统通过往培养液中通入空气形成源源不断上升的小气泡,该小气泡上升过程中不仅充分混合培养液与氧气,气泡破裂时形成的局部湍流还向肾切片提供必要的液体剪切力刺激,尽管如此该培养系统也只能将肾切片的活力延长至24~72 h。POOSTI等^[64]将肾切片置于摇床上含有Williams'E培养基的6孔板中进行培养,以一定速率流动的培养液提供剪切力,发现48 h内肾切片中细胞的存活率仍能满足实验研究,72 h后肾切片活性急剧恶化。其实验结论与Ruegg的研究结果一致。TIAN等^[65]为探究乳腺癌细胞外囊泡对肝和肾的不同趋化性,将肝、肾切片并联置于微流控芯片中培养24 h,培养结束后对肝、肾切片进行苏木素-伊红(HE)染色和趋化因子浓度检测,得出其具有强烈的肝趋向性而不是肾趋向性与动物模型一致的结论,显示出微流控肾芯片模型替代动物模型的可行性。

4 微流控芯片在中药毒理学中的应用

每年使用中药造成的毒性损伤报告中,肝、肾毒性的报告占了绝对的比重。微流控肝、肾芯片模型由于肝、肾结构更加贴合体内微环境,且直接暴露于药物,契合中药部分有效物质浓度低、给药时间长、重复给药的药物研究特点,故而其在中药毒理研究中的应用日益广泛。

4.1 微流控肝芯片在中药毒理中的应用

4.1.1 肝毒性评价结合传统测定方法 蔡乐^[66]研制了一款具有3层结构的肝小叶芯片。并且以AST、丙氨酸氨基转移酶(ALT)值为指标,测定4种明确具有肝毒性的中药成分(氧化苦参碱、吴茱萸碱、油酸、氯化两面针碱)随时间、浓度变化的肝损伤趋势;以噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞活力,计算氧化苦参碱、吴茱萸碱、油酸、氯化两面针碱在该芯片给药测试中的半数抑制浓度(IC₅₀) (21.54 mmol·L⁻¹、83.13 μmol·L⁻¹、6.16 mmol·L⁻¹、5.14 mg·L⁻¹)。微流控培养的肝小叶芯片得出的IC₅₀值对比于孔板实验测得IC₅₀值(7.61 mmol·L⁻¹、19.75 μmol·L⁻¹、1.05 mmol·L⁻¹、3.36 mg·L⁻¹)显著性增大。推测其原因一方面是由于U937细胞(人组织淋巴瘤细胞系)和HUVEC细胞,模拟的肝脏血管和Kupffer细胞,结合LX-2细胞(人肝星状细胞系)和聚碳酸酯多孔膜模拟的Disse腔结构,能在一定

程度上抵抗肝毒性物质进入下层的HepG2细胞培养腔。另一方面部分肝毒性物质及代谢废物能从HepG2细胞培养腔流入更下层的储液池减小有毒物质的蓄积浓度。

同样为了验证苦参的肝毒性,蔡乐^[66]采用微流控肝脏类器官芯片,在含有0~40 mmol·L⁻¹浓度梯度的氧化苦参碱的培养基中培养24~48 h,通过测定生化指标、细胞活性等方法确定其肝毒性并测出IC₅₀值为21.54 mmol·L⁻¹。而JIANG等^[67]则使用18只大鼠,连续灌胃14 d, (1.25、2.5 g·kg⁻¹)以验证氧化苦参碱的肝毒性。从以上对比来看,微流控肝芯片具有给药所需时间短、实验药物浓度低、减少或避免动物受到伤害、对操作者技能熟练度要求友好等特点,更加适应中药给药时间长、部分有效物质浓度低的研究特点与难点。

4.1.2 肝毒性评价结合新技术 中药蓄积毒性的评价在现有的细胞、动物毒性评价模型中难以得到准确的预测,朱丽颖等^[68]结合3D生物打印技术与微流控技术,用EA.hy926细胞(人脐静脉内皮细胞)与HepG2细胞,构建一款三维动态类器官模型,用于对三款已上市的活血化瘀类复方中药注射剂(香丹注射液、冠心宁注射液、参附注射液)进行肝脏安全性再评价。其中在将香丹注射液原药浓度稀释100倍并对模型进行单次给药后,利用高内涵分析(HCA)进行全自动细胞成像,发现该药具有明显的毒性趋势,提示长期使用有引起药物性肝损伤的风险。LI等^[69]将微流控系统与单细胞、钙离子荧光成像相结合,设计出一款以单个癌细胞胞质钙浓度为指标,实时监测异甘草素对白血病细胞的毒性作用的微流控芯片。

目前许多微流控芯片都是采用终点测定的方式,或者在微流控培养液循环系统中设置便于重复采样的取样阀门。但是随着药理、毒理研究的手段和方法的日新月异,需要检测的指标也越加精细和复杂。整合各类仪器及电子元件从而构建实时监测的微流控体系,是微流控芯片迈向自动化、大数据信息化发展方向的重要研究内容。

4.2 微流控肾芯片在中药毒理中的应用

4.2.1 肾毒性评价 肾脏相关的多种类细胞按照特定空间三维组合的方式组成的类器官培养物,是目前中药研究中构建肾芯片的主流方式^[70]。许贺然^[71]构建了一种模拟肾单位三维结构的肾微流控芯片,比较了不同浓度下的商陆皂苷甲(ESA)对SD大鼠来源的原代肾小管上皮细胞和微血管内皮

细胞的毒性作用,得出相同浓度下微流控体系相较于孔板培养表现出更小的肾脏毒性作用。该芯片由上下2层聚碳酸酯(PC)板夹着4层聚二甲基硅氧烷(PDMS)板构成,流动相和待测定液分别从2个灌流口进入芯片,通过浓度梯度发生层的树状微通道不断分流混合,从而产生不同浓度的混合液,该混合液最终流入对应的类器官培养腔室,实现一块芯片高通量的检测不同浓度药液的目的,生成梯度浓度待测液的设计大大提高了微流控芯片在药理、毒理方向的实用性。但该方法使用无法长期培养的原代细胞,所以只适用于急性肾脏毒性的药物检测;同时该芯片也未能模拟肾毛细血管等组织,无法真实模拟肾脏遭遇损害时,系膜细胞吞噬、清除异物等影响毒性表现的代偿性行为。LI等^[72]将人胚胎肾细胞包埋在明胶甲基丙烯酸酯(GelMA)中,置于PDMS制备的芯片培养腔室中,以DMEM培养基灌流,用于评价薄荷主要生物活性物质-山奈酚的肾毒性,与动物实验结果—薄荷无毒,相互印证。

4.2.2 肾毒性机制研究 CHANG等^[73]将用凝胶作为原代的肝实质细胞的细胞外基质、I型胶原蛋白作为近端肾小管上皮细胞的细胞外基质,分别构建了个体微生理系统芯片,并将其以缓冲液为流动相,用聚乙烯管相互串联,用于测定马兜铃酸在体内肝肾毒性机制。最终发现尽管高浓度的马兜铃酸对肾脏已有直接毒性,但是马兜铃酸在肝脏中经过硝化还原及与硫酸盐结合,形成了肾毒性更大的马兜铃酸硫酸盐耦合物。这也使得与单一的肾芯片相比,肝、肾串联芯片测定的马兜铃酸肾毒性增加了4倍。这一实验说明了研究筛选药物时,多脏器共同作用的重要性。

微流控芯片除了探究正常人体状态下对药物的代谢机制外,还可以构建病理模型,对药物进行研究。如ZHOU等^[74]利用相互对立的肾小球内皮细胞层和足细胞层构建的芯片通道,模拟肾小球高血压的肾脏疾病病理模型,从而用于筛选药物和测试毒性。WANG等^[75]利用肾小球内皮细胞、足细胞和基底膜构建模拟肾小球结构的微流控芯片,成功用高浓度葡萄糖诱导形成糖尿病肾病模型,以重现细胞或动物模型中难以模拟的高浓度葡萄糖诱导的临界病理反应,为相关机制研究提供平台。WANG等^[76]利用犬肾细胞(MDCK)和假狂犬病病毒(PRV)构建病毒诱导肾功能不全模型,探究病毒性肾功能障碍的机制,最终发现重吸收屏障破坏、Na⁺转运蛋白和肾脏微绒毛发生了电解质调节功能

障碍是最终导致病毒性肾功能障碍的原因。

5 讨论

体外培养系统常见的评估指标包括:细胞形态、细胞活力、功能稳定性、代谢能力、长期培养下特异性基因表达的保持能力等^[77]。类器官或器官芯片与传统2D培养的细胞模型相比,形成细胞极化现象,这意味着细胞之间旁分泌、自分泌等细胞-细胞,细胞-基质之间的信息交流趋近于体内正常水平^[78]。同时在肝脏芯片、肾脏芯片的长期培养过程中,3D培养的器官或类器官对于维持正常生理功能、保持特异性表型具有明显优势,对药物长期毒性的敏感度也更高^[79-81]。而微流控技术在3D器官芯片或类器官芯片培养中的应用,不仅能去除培养基中积累的可能有毒或引入细胞功能/活力的自我反馈抑制的物质或代谢物(如尿素、胆汁酸盐),还能为培养物提供稳定的生存所必需的营养物质、生理剪切力刺激^[82]。

但微流控技术目前仍有许多需要解决的技术难题,如微流控芯片模拟细胞或器官人体微环境时,不同培养物、不同时期所需要的剪切力大小不同;多种芯片串联后不同芯片之间流速与剪切力的差异等。当剪切力过高会加剧组织切片的纤维化进程,或干扰细胞黏附芯片表面生长或细胞膜表面通道与外界正常的物质交换过程;当剪切力过低,除了影响营养物质及代谢废物更新速度,诸如内皮细胞等的连接紧密程度将会减小。如心脏芯片与骨骼芯片相连接,就需要考虑体内各脏器/组织的剪切力微环境,包括血管内皮细胞源源不断受到血液流动的剪切力影响^[83-84],骨骼受到滑膜液的静态压^[85],骨骼肌细胞受到瞬时拉伸^[86],心肌细胞受到心脏周期性搏动的收缩舒张拉力^[87]等。

中药尤其是中药组方,有效物质基础含量低、给药周期长。微流控芯片允许重复给药,且给药浓度可低至微克、纳克的特点恰好能够解决中医药研究的痛点。目前用于分析的微流控芯片开发相对比较成熟,已有市售微流控芯片可应用于中药炮制、中药鉴定、中药化学、中药分析等领域。用于药理、毒理研究尤其是仿生性的微流控芯片起步较晚,仍有许多困难点亟需研究解决,如人源原代细胞或组织存在伦理及供给稀少、干细胞的分化和表型难维持、永生化细胞代谢与人体正常细胞存在差距等。尽管如此,相信未来微流控芯片与各类传感器结合,如荧光显微镜、原位色谱仪、氧气浓度传感器、压力传感器等实现全过程、多角度的动态检测

和分析,多组织芯片的相互串联、工业化的制备实现高通量、大数据分析,将为药理、毒理学的研究提供革命性的新方法、新工具。故而可以预见未来在中药毒理学的研究中,微流控肝、肾芯片技术的使用会越来越广泛。

[参考文献]

- [1] YANG B, XIE Y, GUO M, et al. Nephrotoxicity and Chinese herbal medicine[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2018, 13(10):1605-1611.
- [2] 彭朋,元唯安. 中药药源性肝毒性的研究进展[J]. 药物评价研究, 2021, 44(8):1783-1792.
- [3] SHEN Q Q, WANG J J, ROY D, et al. Organic anion transporter 1 and 3 contribute to traditional Chinese medicine-induced nephrotoxicity[J]. Chin J Nat Med, 2020, 18(3):196-205.
- [4] 方肇伦. 微全分析系统—分析仪器的方向与前沿[J]. 科学新闻, 2001(1):7-8.
- [5] RONALDSON-BOUCHARD K, TELES D, YEAGER K, et al. A multi-organ chip with matured tissue niches linked by vascular flow[J]. Nat Biomed Eng, 2022, 6(4):351-371.
- [6] MANZ A, GRABER N, WIDMER H Á, et al. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing[J]. Sens Actuators B Chem, 1990, 1(1/6):244-248.
- [7] MANZ A, HARRISON D J, VERPOORTE E M, et al. Miniaturization of chemical analysis systems-A look into next century's technology or just a fashionable craze?[J]. Chimia, 1991, 45(4):103.
- [8] MCDONALD J C, DUFFY D C, ANDERSON J R, et al. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)[J]. Electrophoresis, 2000, 21(1):27-40.
- [9] THORSEN T, MAERKL S J, QUAKE S R. Microfluidic large-scale integration[J]. Science, 2002, 298(5593):580-584.
- [10] KHAMSI R. Labs on a chip: Meet the stripped down rat[J]. Nature, 2005, 435(7038):12-13.
- [11] AZIMI-BOULALI J, MADADELAHI M, MADOU M J, et al. Droplet and particle generation on centrifugal microfluidic platforms: A review[J]. Micromachines (Basel), 2020, 11(6):253.
- [12] 康维嘉. 微流控芯片UV光固化微注射成型的实验研究与模拟[D]. 北京:北京化工大学, 2017.
- [13] KYFFIN J A, SHARMA P, LEEDALE J, et al. Impact of cell types and culture methods on the functionality of *in vitro* liver systems-A review of cell systems for hepatotoxicity assessment[J]. Toxicol In Vitro, 2018, 48:262-275.
- [14] AZIZIPOUR N, AVAZPOUR R, ROSENZWEIG D H, et al. Evolution of biochip technology: A review from lab-on-a-chip to organ-on-a-chip [J]. Micromachines (Basel), 2020, 11(6):33.
- [15] MOSCONA A. Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. A quantifiable approach to cell interactions *in vitro*[J]. Exp Cell Res, 1961, 22:455-475.
- [16] SUTHERLAND R M, MCCREDIE J A, INCH W R. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas[J]. J Natl Cancer Inst, 1971, 46(1):113-120.
- [17] DURAND R E. Adriamycin: A possible indirect radiosensitizer of hypoxic tumor cells[J]. Radiology, 1976, 119(1):217-222.
- [18] FENG H, OU B C, ZHAO J K, et al. Homogeneous pancreatic cancer spheroids mimic growth pattern of circulating tumor cell clusters and macrometastases: Displaying heterogeneity and crater-like structure on inner layer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2017, 143(9):1771-1786.
- [19] ŠTAMPAR M, SEDIGHI FRANDSEN H, ROGOWSKA-WRZESINSKA A, et al. Hepatocellular carcinoma (HepG2/C3A) cell-based 3D model for genotoxicity testing of chemicals [J]. Sci Total Environ, 2021, 755(Pt 2):143255.
- [20] 李朋彦,李春雨,陆小华,等. 基于类器官3D培养和高内涵成像的药物肝毒性评价模型研究[J]. 药学学报, 2017, 52(7):1055-1062.
- [21] 孙跃峰,江剑,王玲,等. 体外三维培养技术在肿瘤中的应用及进展[J]. 大连医科大学学报, 2020, 42(2):166-171.
- [22] ZHAO S P, MA Y, LOU Q, et al. Three-dimensional cell culture and drug testing in a microfluidic sidewall-attached droplet array[J]. Anal Chem, 2017, 89(19):10153-10157.
- [23] JIA Z, CHENG Y, JIANG X, et al. 3D culture system for liver tissue mimicking hepatic plates for improvement of human hepatocyte (C3A) function and polarity [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020:6354183.
- [24] COLTMAN N J, COKE B A, CHATZI K, et al. Application of HepG2/C3A liver spheroids as a model system for genotoxicity studies[J]. Toxicol Lett, 2021, 345:34-45.
- [25] YU F, CHOUDHURY D. Microfluidic bioprinting for

- organ-on-a-chip models[J]. *Drug Discov Today*, 2019, 24(6):1248-1257.
- [26] POWERS M J, DOMANSKY K, KAAZEMPUR-MOFRAD M R, et al. A microfabricated array bioreactor for perfused 3D liver culture[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 78(3):257-269.
- [27] VAN GRUNSVEN L A. 3D *in vitro* models of liver fibrosis[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 121:133-146.
- [28] MATAI I, KAUR G, SEYEDSALEHI A, et al. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering[J]. *Biomaterials*, 2020, 226:119536.
- [29] WANG X, YAN Y, PAN Y, et al. Generation of three-dimensional hepatocyte/gelatin structures with rapid prototyping system [J]. *Tissue Eng*, 2006, 12 (1) : 83-90.
- [30] MA X, QU X, ZHU W, et al. Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(8):2206-2211.
- [31] LI Y, ZHANG T, PANG Y, et al. 3D bioprinting of hepatoma cells and application with microfluidics for pharmacodynamic test of Metuzumab [J]. *Biofabrication*, 2019, 11(3):34102.
- [32] DEWYSE L, REYNAERT H, VAN GRUNSVEN L A. Best practices and progress in precision-cut liver slice cultures[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13):7137.
- [33] OTHMAN A, EHNERT S, DROPMANN A, et al. Precision-cut liver slices as an alternative method for long-term hepatotoxicity studies [J]. *Arch Toxicol*, 2020, 94(8):2889-2891.
- [34] KRUMDIECK C L, DOS SANTOS J E, HO K J. A new instrument for the rapid preparation of tissue slices [J]. *Anal Biochem*, 1980, 104(1):118-123.
- [35] SMITH P F, GANDOLFI A J, KRUMDIECK C L, et al. Dynamic organ culture of precision liver slices for *in vitro* toxicology[J]. *Life Sci*, 1985, 36(14):1367-1375.
- [36] DE GRAAF I A, OLINGA P, DE JAGER M H, et al. Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies [J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(9):1540-1551.
- [37] WU X, ROBERTO J B, KNUPP A, et al. Precision-cut human liver slice cultures as an immunological platform[J]. *J Immunol Methods*, 2018, 455:71-79.
- [38] PAISH H L, REED L H, BROWN H, et al. A bioreactor technology for modeling fibrosis in human and rodent precision-cut liver slices [J]. *Hepatology*, 2019, 70(4):1377-1391.
- [39] VAN MIDWOUDE P M, GROOTHUIS G M, MEREMA M T, et al. Microfluidic biochip for the perfusion of precision-cut rat liver slices for metabolism and toxicology studies [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 105(1):184-194.
- [40] VAN MIDWOUDE P M, MEREMA M T, VERPOORTE E, et al. A microfluidic approach for *in vitro* assessment of interorgan interactions in drug metabolism using intestinal and liver slices [J]. *Lab Chip*, 2010, 10(20):2778-2786.
- [41] 刘婷, 杨依霏, 夏冰, 等. 一种用于中药肝毒性评价的基于微流控体系的精密肝切片培养模型: 中国, CN114854585A[P]. 2022-09-30.
- [42] ASHAMMAKHI N, WESSELING-PERRY K, HASAN A, et al. Kidney-on-a-chip: Untapped opportunities[J]. *Kidney Int*, 2018, 94(6):1073-1086.
- [43] VALVERDE M G, MILLE L S, FIGLER K P, et al. Biomimetic models of the glomerulus [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2022, 18(4):241-257.
- [44] WATERS J P, RICHARDS Y C, SKEPPER J N, et al. A 3D tri-culture system reveals that activin receptor-like kinase 5 and connective tissue growth factor drive human glomerulosclerosis[J]. *J Pathol*, 2017, 243(3):390-400.
- [45] PETROSYAN A, CRAVEDI P, VILLANI V, et al. A glomerulus-on-a-chip to recapitulate the human glomerular filtration barrier[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):3656.
- [46] ESSIG M, TERZI F, BURTIN M, et al. Mechanical strains induced by tubular flow affect the phenotype of proximal tubular cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001, 281(4):F751-762.
- [47] BAUDOIN R, GRISCOM L, MONGE M, et al. Development of a renal microchip for *in vitro* distal tubule models[J]. *Biotechnol Prog*, 2007, 23(5):1245-1253.
- [48] TUFFIN J, BURKE M, RICHARDSON T, et al. A composite hydrogel scaffold permits self-organization and matrix deposition by cocultured human glomerular cells[J]. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8(17):e1900698.
- [49] XIE R, KOROLJ A, LIU C, et al. h-FIBER: Microfluidic topographical hollow fiber for studies of glomerular filtration barrier[J]. *ACS Cent Sci*, 2020, 6(6):903-912.
- [50] WEINBERG E, KAAZEMPUR-MOFRAD M, BORENSTEIN J. Concept and computational design

- for a bioartificial nephron-on-a-chip [J]. *Int J Artif Organs*, 2008, 31(6):508-514.
- [51] JANG K J, SUH K Y. A multi-layer microfluidic device for efficient culture and analysis of renal tubular cells[J]. *Lab Chip*, 2010, 10(1):36-42.
- [52] 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, 1:69.
- [53] HOMAN K A, KOLESKY D B, SKYLAR-SCOTT M A, et al. Bioprinting of 3D convoluted renal proximal tubules on perfusable chips [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 34845.
- [54] SINGH N K, HAN W, NAM S A, et al. Three-dimensional cell-printing of advanced renal tubular tissue analogue[J]. *Biomaterials*, 2020, 232: 119734.
- [55] RAYNER S G, HOWARD C C, MANDRYCKY C J, et al. Multiphoton-guided creation of complex organ-specific microvasculature [J]. *Adv Healthc Mater*, 2021, 10(10):e2100031.
- [56] ADHIKARI J, ROY A, DAS A, et al. Effects of processing parameters of 3D bioprinting on the cellular activity of bioinks[J]. *Macromol Biosci*, 2021, 21(1): e2000179.
- [57] SAITTA B, JALILI M F, ZOHOORKARI H, et al. *Ex vivo* kidney slice preparations as a model system to study signaling cascades in kidney epithelial cells[J]. *Methods Cell Biol*, 2019, 153:185-203.
- [58] BIGAEVA E, GORE E, MUTSAERS H, et al. Exploring organ-specific features of fibrogenesis using murine precision-cut tissue slices[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(1): 165582.
- [59] KNOUZY B, DUBOURG L, BAVEREL G, et al. Targets of chloroacetaldehyde-induced nephrotoxicity [J]. *Toxicol In Vitro*, 2010, 24(1):99-107.
- [60] BAVEREL G, KNOUZY B, GAUTHIER C, et al. Use of precision-cut renal cortical slices in nephrotoxicity studies[J]. *Xenobiotica*, 2013, 43(1):54-62.
- [61] JENSEN M S, MUTSAERS H, TINGSKOV S J, et al. Activation of the prostaglandin E₂ EP₂ receptor attenuates renal fibrosis in unilateral ureteral obstructed mice and human kidney slices [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2019, 227(1):e13291.
- [62] 李昕, 王芷宁, 付璐, 等. 缺血-再灌注氧化损伤机制及其对不同器官功能的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(7):149-154.
- [63] RUEGG C E, GANDOLFI A J, BRENDEL K. Preparation and incubation of precision-cut, positional renal slices [J]. *Pharmacol Methods*, 1987, 17: 111-123.
- [64] POOSTI F, PHAM B T, OOSTERHUIS D, et al. Precision-cut kidney slices (PCKS) to study development of renal fibrosis and efficacy of drug targeting *ex vivo* [J]. *Dis Model Mech*, 2015, 8(10): 1227-1236.
- [65] TIAN H, PANG J, QIN K, et al. A novel tissue-based liver-kidney-on-a-chip can mimic liver tropism of extracellular vesicles derived from breast cancer cells [J]. *Biotechnol J*, 2020, 15(2):e1900107.
- [66] 蔡乐. 基于肝器官芯片的中草药成分肝毒性评价[D]. 大连:大连理工大学, 2019.
- [67] JIANG P, ZHANG X, HUANG Y, et al. Hepatotoxicity induced by sophora flavescens and hepatic accumulation of kurarinone, a major hepatotoxic constituent of sophora flavescens in rats [J]. *Molecules*, 2017, 22(11):1809.
- [68] 朱丽颖, 杜宏英, 何宇涵, 等. 基于生物打印3D细胞微流控芯片的常用中药注射液肝脏安全性再评价[J]. *中南药学*, 2021, 19(11):2304-2310.
- [69] LI X, XUE X, LI P C. Real-time detection of the early event of cytotoxicity of herbal ingredients on single leukemia cells studied in a microfluidic biochip [J]. *Integr Biol (Camb)*, 2009, 1(1):90-98.
- [70] 丛焯, 王佑平, 韩夏荷, 等. 用于药物毒性评价的微流控器官芯片技术[J]. *世界中医药*, 2020, 15(23): 3536-3544.
- [71] 许贺然. 一种肾微流控芯片的构建及应用[D]. 大连:大连理工大学, 2020.
- [72] LI X, TIAN T. Phytochemical characterization of *Mentha spicata* L. under differential dried-conditions and associated nephrotoxicity screening of main compound with organ-on-a-chip [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:1067.
- [73] CHANG S Y, 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.
- [74] ZHOU M, ZHANG X, WEN X, et al. Development of a functional glomerulus at the organ level on a chip to mimic hypertensive nephropathy [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31771.
- [75] WANG L, TAO T, SU W, et al. A disease model of diabetic nephropathy in a glomerulus-on-a-chip microdevice [J]. *Lab Chip*, 2017, 17(10):1749-1760.
- [76] WANG J, WANG C, XU N, et al. A virus-induced

- kidney disease model based on organ-on-a-chip: Pathogenesis exploration of virus-related renal dysfunctions[J]. *Biomaterials*, 2019, 219: 119367.
- [77] 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.
- [78] COLLETT S, TORRESI J, SILVEIRA L E, et al. Investigating virus-host cell interactions: Comparative binding forces between hepatitis C virus-like particles and host cell receptors in 2D and 3D cell culture models [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2021, 592: 371-384.
- [79] DIEKJÜRGEN D, GRAINGER D W. Drug transporter expression profiling in a three-dimensional kidney proximal tubule *in vitro* nephrotoxicity model [J]. *Pflugers Arch*, 2018, 470(9): 1311-1323.
- [80] MUGURUMA M, TERAOKA S, MIYAHARA K, et al. Differences in drug sensitivity between two-dimensional and three-dimensional culture systems in triple-negative breast cancer cell lines [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 533(3): 268-274.
- [81] FOSTER A J, CHOUHAN B, REGAN S L, et al. Integrated *in vitro* models for hepatic safety and metabolism: Evaluation of a human liver-chip and liver spheroid [J]. *Arch Toxicol*, 2019, 93(4): 1021-1037.
- [82] DEGUCHI S, TAKAYAMA K. State-of-the-art liver disease research using liver-on-a-chip [J]. *Inflamm Regen*, 2022, 42(1): 62.
- [83] MEHTA V, PANG K L, ROZBESKY D, et al. The guidance receptor plexin D₁ is a mechanosensor in endothelial cells [J]. *Nature*, 2020, 578(7794): 290-295.
- [84] SEYMOUR R S, HU Q, SNELLING E P. Blood flow rate and wall shear stress in seven major cephalic arteries of humans [J]. *J Anat*, 2020, 236(3): 522-530.
- [85] BABALIARI E, PETEKIDIS G, CHATZINIKOLAIDOU M. A precisely flow-controlled microfluidic system for enhanced pre-osteoblastic cell response for bone tissue engineering [J]. *Bioengineering (Basel)*, 2018, 5(3): 66.
- [86] JIA L, WANG L, WEI F, et al. Effects of Caveolin-1-ERK1/2 pathway on endothelial cells and smooth muscle cells under shear stress [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2020, 245(1): 21-33.
- [87] VAEZ S A, EBRAHIMI-BAROUGH S, SOLEIMANI M, et al. The cardiac niche role in cardiomyocyte differentiation of rat bone marrow-derived stromal cells: comparison between static and microfluidic cell culture methods [J]. *Excli J*, 2018, 17: 762-774.
- [责任编辑 周冰冰]