◇ 综述与讲座 ◇

http://www.cjcpt.com
2026 Jul; 31(7): 975-989

新型体外肝脏代谢模型及其应用进展

卢思翰[1,2]，鲍广霖[1,2]，孙建国[1,2,3]

[1] 中国药科大学江苏省药物代谢动力学研究重点实验室，南京 210009，江苏；
[2] 中国药科大学多靶标天然药物全国重点实验室，南京 210009，江苏；
[3] 中国医学科学院，“中药复杂组分 PK-PD 结合研究”创新单元，北京 100730

摘要 药物的肝脏代谢研究对药物开发、临床用药指导及药物安全性评估具有重要意义。传统体外肝脏模型虽应用广泛，但在功能维持、预测准确性与生理模拟方面存在局限性，促使多种新型体外肝脏模型被开发。现有综述多侧重于新型模型构建技术的介绍或性能的比较，而系统梳理不同新型模型在药物代谢研究中应用特点的文献较少。在综述近年来新型体外肝脏模型特点及其所采用新技术的基础上，本文进一步将模型功能特性与具体药物代谢研究应用场景对应分析，归纳其在代谢稳定性、代谢物鉴定与药物相互作用评估等方面的表现。以期为体外模型的合理选择与规范化应用提供参考，支持药物的临床前研究与临床应用。

关键词 肝脏；生物转化；体外研究；代谢清除率；药物相互作用

中图分类号：R969.1
文献标志码：A
文 章 编 号：1009-2501(2026)07-0975-15
doi: 10.12092/j.issn.1009-2501.2026.07.014

人体每日均会暴露于来自食物、饮水、空气以及药物等渠道的数百种外源性化学物质当中。这些化合物中多数具有高度亲脂性，极易在体内蓄积。这种蓄积倾向显著增加了体内潜在毒性反应的风险。人体对大多数药物具有高效的代谢系统，能够将药物从亲脂性物质转化为亲水性物质，这一过程对于人体用药安全来说意义重大。肝脏是人体内对于外源性物质代谢贡献最大的器官：人肝脏细胞的滑面内质网中含有极其丰富的细胞色素 P450（cytochrome P450, CYP450），约占人体总 CYP450 含量的 70%～80%。而根据统计，Ⅰ相代谢中，约占美国 60% 的常用处方药在人体内的生物转化由 CYP450 酶系催化完成[1]。Ⅱ相代谢中，约 40%～70% 的外源物质经由肝脏中的尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶（uridine diphosphate glucuronosyltransferase, UGT）代谢。同时，肝脏细胞膜上也具有多种摄取和外排转运蛋白[2]。因此，肝脏的药物代谢研究尤为重要。

在药物代谢研究中，研究药物在肝脏代谢的实验模型通常分为体内代谢模型和体外代谢模型。由于体内模型具有较高的综合性、复杂性和成本，其更多在药物开发的后期阶段用于验证体外实验所得的数据。体外实验则能够通过使用少量的测试药物和相对容易构建的模型，针对特定问题进行研究。其次，体内代谢实验常用到动物相关的模型，而体外肝脏模型许多基于人体构建，例如人肝脏细胞系，原代人肝细胞（primary human hepatocytes, PHH）等，这在一定程度上能够减少物种差异性对药物前期研究结果的影响。此外，美国国会于 2022 年底通过了 S.5002-FDA Modernization Act 2.0（即《美国食品药品监督管理局现代化法案 2.0》，简称 FDA 现代化法案 2.0），考虑到动物实验存在的种属差异问题与伦理争议，该法案取消了“新药进入人体临床试验前必须进行动物实验”的强制性要求。法案通过后，业界普遍认可在临床试验前采用与人体高度相关的体外模型替代动物实验的做法。为了达到替代动物实验的标准，体外模型正经历一场技术革命，不少

2025-12-11 收稿　2026-02-13 修回
中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目（2021-I2M-5-011）
卢思翰，男，硕士研究生，研究方向：临床前药代动力学。
E-mail: 3223071772@stu.cpu.edu.cn
孙建国，通信作者，男，博士，研究员，博士生导师，研究方向：临床前药代动力学，中药药代动力学研究。
E-mail: jgsun@cpu.edu.cn

能够准确模拟人体生理特征的新兴体外模型得到发展[3]。一些新型的体外肝脏代谢模型也被开发并运用于药物的代谢研究之中。王颖的综述曾系统性地回顾并归纳了 2018 年为止体外肝脏模型的主要特征，并着重分析了其在毒理学研究中的进展[4]。然而，新型体外肝脏模型在药物体外代谢研究领域的发展尤为迅速。鉴于此，截至 2025 年，亟须对新型体外肝脏代谢模型进行一次全面的、系统性的总结。本文首先对传统与新型体外肝脏代谢模型进行系统分析与比较，随后重点介绍新型模型在药物代谢评价中的应用。以期为药物临床前研究提供参考，指导合适的体外肝脏代谢模型的选择。

1 传统体外肝脏代谢模型

应用于药物代谢研究的传统体外肝模型包括亚细胞组分模型和细胞培养模型等。

常用的亚细胞组分模型包括人肝微粒体和人肝 S9。人肝微粒体通过差速离心法，从手术切除下来的人的肝组织中制备。人肝微粒体实验操作较简便，储存简单方便，被广泛用于体外代谢稳定性研究和 CYP450 介导的药物-药物相互作用（drug-drug interactions, DDI）[5]。但是，由于肝微粒体缺乏 *N*-乙酰基转移酶（N-acetyltransferase, NAT）、磺基转移酶（sulfotransferases, SULT）、谷胱甘肽硫转移酶（glutathione S-transferases, GST）这些亚细胞结构没有的酶和细胞质辅助因子，一些在完整肝细胞中会形成的代谢物，在肝微粒体中无法代谢生成。此外，与完整肝细胞中的复杂环境不同，肝微粒体在孵育实验时会很快与药物分子接触，并且与其他酶没有竞争关系，这使其在代谢评价时容易出现误差。肝 S9 通过匀浆离心后提取获得，其由于具有完整的Ⅰ相和Ⅱ相代谢酶，因此可以用于代谢产物系统的定性研究。但是其代谢酶活性较低，通常不能进行定量研究[6]。

在体外药物代谢评价中，常用的细胞模型包括二维培养的 HepG2 与 HepaRG 细胞，以及悬浮或平面培养的 PHH。HepG2 细胞是一种由肝母细胞瘤衍生的永生化细胞系[7]，其培养成本低、培养周期短。然而，HepG2 细胞的大部分 CYP450 的转录水平和酶活性要比原代肝细胞低得多，而这可能导致代谢评估时出现较大误差[8]。HepaRG 细胞同样是一种永生化细胞系，最初从一例女性肝细胞癌患者的肿瘤组织中分离[9]。经过适当条件诱导，HepaRG 细胞能够分化为同时包含肝细胞样细胞和胆管样上皮细胞的细胞群体[10]。分化后的 HepaRG 肝细胞样细胞具有高水平的 CYP450 酶活性、药物转运体以及核受体，这使其在体外代谢实验中成为 PHH 的良好替代模型。此外，相较于 PHH，HepaRG 细胞获取难度低，活性维持时间长，故也经常应用于长期给药实验[11]。尽管 HepaRG 细胞功能强大，但它仍源于肿瘤组织，并不能完全代表所有 PHH 的特性，因此也具有一定局限性。

PHH 被认为是研究人类肝脏代谢的“黄金标准”，一般从病人手术后切下的正常肝组织中分离出来。相较永生化细胞系，PHH 的代谢酶活性更接近新鲜人肝组织；而相较亚细胞结构，PHH 具有完整的代谢酶表达系统和完整的生命元素[12]。但是，作为体外模型，PHH 面临的最大问题是其供体来源。PHH 一般是从患者肝活检中获得的，且在分离后，其通常需要复杂的运输和保存方案来维持活性[13]。此外，许多 PHH 的供体并非健康人群，其所得结果受供体疾病状况影响较大。因此，这些结果外推到非患病人群时适用性降低[12]。

2 新型体外肝脏代谢模型

尽管传统的体外肝脏代谢模型已被广泛应用于制药行业的新药发现和临床前研究，但它们同时也存在许多缺陷。无论是亚细胞组分模型，永生化细胞还是 PHH，传统模型中的培养环境均难以模拟器官的生理环境。体外实验产生的数据常被用于通过体外—体内外推（*in vitro* to *in vivo* extrapolation, IVIVE）方法预测人体内参数。然而，这一外推过程的预测可信度仍面临挑战。面对这些挑战，加上产业对更准确体外代谢评估的迫切需求，细胞培养技术正在发生重大变革。近年来，一些新型的体外肝脏代谢模型逐渐发展起来。这些模型大多运用了 3D 培养、细胞共培养、微流控系统培养等新兴的细胞培养技术，其中三明治培养模型，球状体模型，肝脏类器官模型和肝脏芯片模型在药物代谢评价中具有较好的研究前景，它们具有各自的特点与优劣势（Tab.1）。

Tab.1 Overview of novel *in vitro* liver models

Model	Common cell sources	Cell culture techniques	Advantages	Limitations
Sandwich culture model	PHH	Sandwich culture	Well-defined bile canaliculi, sustained metabolic function for extended periods, suitable for hepatobiliary drug-excretion and transporter studies	Limited physiological relevance in two-dimensional formats, limited maintenance of metabolic function
Spheroid model	PHH, iPSC, HepG2, HepaRG	ULA plate culture, hanging drop culture, hydrogel encapsulation, micropatterned plate culture, cell co-culture	High-throughput; long-term maintenance of metabolic function, physiological polarity and extracellular matrix, suitable for metabolism studies of low-clearance drugs	Prone to necrotic-core formation, heterogeneous spheroid formation, challenging real-time monitoring of spheroid interiors
Liver organoid model	Liver tissue, iPSC	Cell co-culture, hydrogel encapsulation, scaffold engineering	High fidelity to organ biology, long-term maintenance of metabolic function, suitable for studies of inter-individual variability	Prone to necrotic-core formation, complex culture procedures, high cost
Liver-on-a-chip	PHH, iPSC, HepG2, HepaRG	Microfluidic integration, micropatterned culture, cell co-culture, three-dimensional scaffold culture	High physiological relevance, Reduced susceptibility to central necrosis, long-term maintenance of metabolic function, real-time online monitoring, precise control of microenvironmental physiological parameters, suitable for complex metabolic studies	High technical barrier, high cost

PHH: primary human hepatocytes; iPSC: induced pluripotent stem cells; ULA: ultra-low attachment surface.

2.1 三明治培养模型 “三明治培养模型”(sandwich-cultured hepatocytes, SCH)是一种先进的体外细胞培养技术，主要用于培养 PHH。构建三明治培养的人肝细胞(sandwich-cultured human hepatocytes, SCHH)的基本流程为：先在培养面上铺一层基质并接种肝细胞，待细胞贴壁稳定后，再在其上方覆盖第二层基质，形成“基质—细胞—基质”的三明治结构[14]。在这种结构中，培养的 PHH 肝脏代谢酶的表达能维持一段时间，同时保持白蛋白分泌能力和整体转录活性，并逐渐形成完整的胆小管结构[15]。与普通平板培养的 PHH 相比，它们在代谢酶和转运蛋白的表达水平上表现出显著提升。SCHH 在测定肝脏胆汁排泄率[16]、预测参与药物相互作用的化合物抑制与诱导潜力[17-18] 等多个临床前代谢研究均有应用。

2.2 球状体模型 球状体是由细胞聚集形成的集合体，通常呈现为固态球状结构[19]，可以包含一种或多种细胞类型。与传统的 2D 肝细胞模型相比，球状体模型能更好地反映药物、代谢废物、营养物质和气体在自然环境中的梯度分布，从而更真实地模拟细胞外基质(extracellular matrix, ECM)、细胞间相互作用对药物代谢的影响[20]。球状体的形成原理可以总结为，在避免细胞附着于其他表面的前提下，促使细胞与邻近细胞相互黏附。

2.2.1 *形成肝细胞球状体的基本策略* 通常来说，将细胞培养成球状体的培养方式可分为有支架或无支架两种。

有支架的培养方法中，支架通常被用作 ECM 的模拟物。在此类环境中，细胞得以生长并聚集形成球状体，从而促进肝细胞在微环境中的功能性表现。此外，可以根据实验要求，通过调整支架的浓度和理化参数精确控制球体培养物的尺寸、形态和位置。但由于这些支架通常由非人源材料构成，它们的生物相容性是一大问题[21]。形成球状体所使用的支架通常以水凝胶的状态构

建。水凝胶是一种由交联的聚合物簇或胶体簇组成的三维网络结构支架，它的亲水基团让它能够吸收大量水分并在水中膨胀，维持三维结构[22]。通过调节浓度和制备参数，可以调整控制水凝胶的结构特征和生物降解性[23]。水凝胶可以分为天然的和合成的。将肝细胞球体封装于天然水凝胶中时，其肝脏分泌功能及标志物表达会得到促进。此外，与 2D 培养或未封装于水凝胶中的肝细胞球状体相比，这些封装于天然水凝胶中的球状体会受到不同 ECM 分子产生的不同影响[24]。大多数合成水凝胶是通过合成聚合物聚合成的。虽然合成水凝胶缺乏生物活性，但其生产过程更为简便，且具有较高的加工灵活性[25]。合成水凝胶常用于构建三维神经培养、骨组织、软骨组织及肾脏组织，而对于构建肝细胞球状体方面的应用较少。

无支架球状体法通常通过限制细胞与培养底物的黏附，使细胞处于悬浮状态。在悬浮条件下，细胞依靠自身黏附能力自发聚集，形成三维细胞聚集体。该方法依赖于细胞间相互作用，通常完全依赖细胞黏附特性，需要一定时间才能形成稳定的细胞聚集体[26]。无支架球状体法包括悬滴法和超低附着（ultra-low attachment，ULA）板培养法。悬滴法通常依靠表面张力在培养皿盖内侧形成液滴，分散的单一细胞在液滴内于重力作用下聚集于液滴底部，并逐渐形成球状体[27]（Fig.1）。悬滴法的成本较低，形成的球体尺寸可控，且适用于多细胞共培养[28]。但是，悬滴法中，倒置的盖内侧最多只能承载 50 μL 的悬液，超过这个体积的悬滴会难以维持形体并滴落，这导致可形成的球状体体积较小，对实验过程造成较大限制。ULA 板培养法是使用 ULA 板制备高质量的细胞球状体的方法。ULA 板板底的表面一般涂覆了一层特殊的、呈中性电荷的亲水性水凝胶，这样可以阻止细胞与培养皿表面黏附，从而促进细胞-细胞相互作用并相互黏附，形成多细胞球体。另外，许多 ULA 板的板底会设计成 U 型底和圆形底，这些设计均有利于细胞球状体的形成（Fig.1）。ULA 板法操作简便，自动化兼容性强，球状体形成效率高，通常仅需 5 ~ 7 d 即可形成成熟细胞球状体。此外，用 ULA 板培养获得的球状体具有接近的培养体积和条件，且生长速率相近，这使得其与其他培养方法相比可重复性高[29]。

总的来说，无支架法因为操作简便、高通量且形成的球状体之间差异小、成本效益高，仍是构建肝细胞球状体模型时使用最多的方法。不过，由于有支架模型能够更真实地模拟肝的微环境并维持肝细胞的长期功能，它们在高生理相关性和长期的研究中运用较多。这两种方法可以互为补充，兼顾研究的效率和生物学相关性。

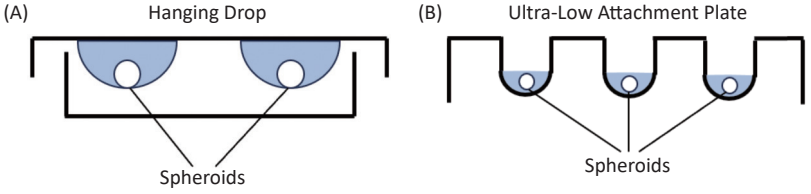


Fig.1 Schematic diagram of common scaffold-free spheroid formation methods
(A) Hanging drop method: droplets formed by surface tension on the inner side of the lid, dispersed single cells within each droplet settle under gravity and gradually aggregate into spheroids; (B) ultra-low attachment plate method: generation of high-quality cellular spheroids using ultra-low attachment plates.

2.2.2 肝细胞球状体的细胞来源 HepG2 细胞易于在多孔 ULA 板中形成球状体，故多应用于高通量的研究[30]。相较于单层培养，球状体模型显著提升了 HepG2 载脂蛋白、血清白蛋白等肝功能标志物以及 CYP450 代谢酶的表达水平，也更易于细胞的成熟与分化[30]。HepG2 细胞球状体能持续存活和增殖至少 28 d，这也让它具备长期、重复给药研究的能力。不过，同正常肝细胞形成的球状体相比，源自肝癌细胞的 HepG2 细胞难以复制肝细胞在体内的情况。此外，尽管其在球状体培养中其代谢酶的表达有所提升，但仍与正常肝细胞存在一定差距。

与 HepG2 细胞相似，HepaRG 细胞也常采用 ULA 板法形成球状体，并展现出比平面培养更优异的分化能力和代谢酶水平以及更长的寿命（球体的形态和功能可维持长达 28 d）[31-32]。由于较

低的费用和接近的代谢酶水平，HepaRG 细胞在替代原代肝细胞作为代谢研究的平台的潜力很大。

2018 至 2020 年间，有几项研究采用 PHH 与非实质细胞构建的三维球状体模型[33-34]。这些模型可以构建更贴近生理环境的实验体系，并在一段时间内维持充分的代谢活性[35]。相比之下，平板培养中代谢酶活性维持时间有限，通常仅适用于急性代谢评价，该改进则在一定程度上克服了这一不足。如今，在临床前代谢研究中，也有仅由 PHH 细胞形成的球状体模型，这些模型可在 1 周内形成稳定球体，并可在较长时间内用于研究药物代谢的过程[36]。这种模型构建时间短，对 PHH 的消耗量较少，非常适用于高通量且需要接近人体环境的代谢实验。

2.3　肝脏类器官模型　类器官是一种组织内干细胞、胚胎干细胞或诱导性多能干细胞（induced pluripotent stem cells, iPSC）形成的体外 3D 细胞簇。其表现出与建模器官不同程度的器官型相似性，具有自我更新和自我组织的能力[37-38]。经实验验证，肝类器官即使在长期增殖后仍能保持着肝脏的原始特性，保持稳定的 CYP450 酶表达[39]，这使得它相较传统肝代谢模型能够更长久地保留人体代谢功能。同时，肝类器官可以在尽可能接近体内微环境的情况下实现稳定的人源化代谢模型产出，从而消除了种属差异性，大大增加了实验的可持续性和实验结果的真实性。此外，肝类器官在构建患者来源及个体化体外模型方面展现出较大潜力，可用于研究个体差异对药物代谢的影响。

2.3.1　*肝组织来源的肝脏类器官*　肝组织来源的类器官通常以胆管细胞[40]、胎儿肝细胞[41]、肝干/祖细胞[42] 为起始材料，通过体外培养建立正常肝脏类器官体系。此外，肝肿瘤细胞经适当培养也可形成肝肿瘤类器官[43]。肝脏类器官的培养过程通常分为两个阶段。首先，将肝组织通过胶原酶等消化酶处理为单细胞悬液，经筛网过滤后包埋于基质凝胶中形成微球结构。随后，在培养体系中加入肝细胞生长因子、表皮生长因子等促进细胞增殖的因子，以及地塞米松、骨形态发生蛋白等诱导肝细胞成熟的细胞因子，以支持类器官的生长与分化[44]。

肝组织来源的肝脏类器官在代谢研究，尤其是高通量的研究中具有较大实用性。首先，肝组织来源的肝类器官具有长期扩增能力。这一能力主要源于其起始细胞（如胆管祖细胞）具备自我更新的特性。在模拟再生微环境的培养条件下，这些细胞能够持续增殖，同时保持组织特性[45]。Broutier 等将健康的成年小鼠肝脏组织提取的细胞在作为细胞外基质的 Matrigel 与生长因子结合的微环境下培养，发现细胞可在培养过程中持续扩增数月，每个肝前体细胞均可扩增出 10^6 个细胞[46]。这说明能够从较少的组织样本扩增出大量的类器官材料，并进行高通量实验[47]，克服了原代肝细胞体外培养寿命短、功能衰退快的问题。第二，经验证，即使经过长期冷冻保存，成熟的肝组织仍可用于建立肝类器官[48]，这一特性对肝组织样本的保存，以及后续代谢实验的可行性和可靠性具有重要意义。第三，肝脏类器官也可来源于确诊疾病或已知基因突变的患者肝组织，并与健康匹配对照组进行比对[49]，有利于探究患者群体等定向特定人群的代谢情况。

2.3.2　*多能干细胞来源的肝脏类器官*　对于多能干细胞来源的肝脏类器官来说，目前通常选用胚胎干细胞或 iPSC 进行培育。iPSC 可由任何供体的细胞制备，例如通过简单抽血获取的细胞，这在一定程度上解决了肝代谢模型长期面临的供体来源受限问题。其基本培育过程如下：首先，将多能干细胞诱导分化为形成人体内诸多消化系统器官（包括肝脏）的共同祖细胞，即终末内胚层细胞（definitive endoderm, DE）。第二步，将 DE 细胞定向分化到肝脏前体，即肝内胚层细胞（hepatic endoderm, HE）。第三步，将细胞从 2D 环境转移到包含 ECM 和生长因子的 3D 基质中，被诱导自组装促成形成被称为“肝芽”的球状 3D 结构。最后，肝芽结构中的前体细胞在特定诱导条件下获得在特殊的扩展培养基中维持类器官的增殖能力，并进一步分化成熟，形成具有药物代谢等功能的成熟肝细胞。这一系列步骤均依赖于对培养基中生长因子及小分子抑制剂的精确调控，以引导细胞逐步完成分化过程[50-51]。但是，肝组织来源的肝类器官主要由上皮细胞构成，而源自 iPSC 的肝类器官则多可从同一细胞系构建多谱系的肝类器官[50, 52]，这更好地模拟了人体内生理环境和肝脏内不同细胞间的相互作用，即异型细胞间相互作用。因此，对于需要更精确模拟体内环境的代谢实验，多能

干细胞来源的肝脏类器官是非常合适的选择。

2.4 肝脏芯片 器官芯片(organ-on-a-chip, OoC)是一种在微流控系统中通过培养细胞构建的生理学增强的器官模型。微流控系统中配备了微通道和微腔,可以大大加速和提高内部化学反应和分析的效率。利用微流体设备进行细胞培养,可以精确控制细胞周围的物理和化学环境,构建细胞微环境,有效模拟了人体器官的结构和功能[53]。肝脏芯片(liver-on-a-chip, LoC)是器官芯片的一个子类别,是一类模拟体内肝脏的微环境和机械刺激的微流控平台,它能高度模拟人体肝脏的关键结构、细胞组成和生理功能[54]。肝脏芯片涵盖的类型多种多样,其中使用的细胞类型、培养方式、流体控制机制均可以根据实验需求来调整。尽管优势明显,肝脏芯片的技术复杂性和高成本也是当下亟须克服的挑战。

为了尽可能接近人体内肝脏微环境,肝脏芯片往往会运用一些新型培养技术。以下将介绍其构建过程中常使用的培养策略。

2.4.1 *细胞共培养* 单细胞类型的肝脏芯片通常用于基础的药物代谢研究[55],然而,这类芯片中的肝细胞无法完全反映生理状态下的肝细胞功能[56],因此在研究复杂代谢过程或追求更高预测准确性时,通常采用细胞共培养技术来构建肝脏芯片。

肝细胞共培养技术是在体外培养系统中,将肝脏的主要功能细胞——肝实质细胞与至少一种非实质细胞共同培养的技术。非实质细胞在体内通过直接或间接的细胞间相互作用,调节肝脏的功能[57]。非实质细胞的加入可使肝细胞接受天然的生物信号,从而更有效地模拟肝脏的稳态与功能,并改善单细胞培养时细胞维持功能时间有限和极性丧失等问题[58]。例如,间充质干细胞在与人肝细胞共培养时可同时改善人肝细胞的功能与存活率[59];原代内皮细胞与肝细胞共培养时,能在维持原代内皮细胞表型的同时增强肝细胞的白蛋白分泌和 CYP450 酶活性[60]。虽然培养了多种肝脏细胞,传统的共培养系统仍很难模拟肝脏的复杂性,因为共培养系统中不同类型的细胞在细胞培养中是随机混合和播种的,不足以充分代表人类肝脏的结构和功能的复杂性[57]。相较之下,肝脏芯片的微流控设备可以通过精确控制环境,产生浓度梯度,控制不同细胞的空间分布,从而再现复杂的细胞间相互作用[61]。

2.4.2 *3D 培养结构* 虽然二维培养结构的肝脏芯片相比常规二维培养更接近人体生理环境,但其肝细胞的功能和基因表达水平仍然较低[62]。而现在的高功能、高保真度肝脏芯片都倾向于采用 3D 培养结构。这种培养方式通常采用了多种策略,包括高通量球状体培养、基质依赖型 3D 培养和微图案化共培养等。

与静态培养的肝细胞球状体模型相比,肝脏芯片可以通过调整微流控系统中的非几何参数,生成更稳健、可重复且适合高通量的三维细胞球。芯片中的细胞球大小和生长环境均可实现可控调节[63]。此外,动态灌流可将氧气和营养物质高效输送到球状体表面,并将代谢废物及时带走。这种高效率的传质可有效解决传统肝细胞球状体培养中出现的坏死中心现象[64]。

对于基质型依赖 3D 培养的肝脏芯片,研究人员将多种天然及合成 ECM 组分应用于肝脏芯片中,成功维持并模拟了天然微环境。这种模型中培养的肝细胞既表现出细胞间相互作用,也表现出细胞-细胞外基质相互作用。同时,它们可维持肝细胞的合成和代谢功能,也具有肝功能模拟能力[65]。微灌流系统能够提供类似体内的生理剪切力和稳定的氧梯度。这些特性使其适用于对生理条件和实验精确度要求较高的研究,甚至可实现实时监测[66]。

微图案化共培养(micropatterned co-culture, MPCC)利用微米级精度技术控制不同类型细胞在培养基底上的空间排列和相互作用。通常,该方法通过光刻技术在培养表面生成细胞可黏附的精确图案(通常为细胞外基质)。譬如 Liu 等使用光刻系统制备出花纹纤维垫,将肝细胞与内皮细胞和成纤维细胞在纤维垫上共同培养,成功模仿出了肝小叶结构并显著增强了肝功能[67]。结合微流控技术,MPCC 在模拟细胞-细胞相互作用的基础上引入了动态流体环境。这一改进解决了物质运输和物理刺激的问题,从而更全面地模拟了肝血窦的生理环境[68]。

2.4.3 *多器官芯片* 建立包括肝脏的多个器官的耦合芯片模型,可描绘其他器官与肝脏的复杂相互作用,从而构建出多器官芯片[69]。连接肝脏与其他器官的多器官芯片有双器官模型,也有超过

两种器官的组合，还有构建更为复杂和全面的人体芯片[70]。常见的连接肝脏的双器官芯片包括肠-肝芯片[71-72]、肺-肝芯片[73]、肝-肾芯片[74]等。这些双器官芯片大多都围绕着药物在人体内的代谢过程来设计。芯片内，根据体内药物流向，设计串联流体通道来连接肝脏模块与其他模块。肠-肝芯片可以模拟药物的吸收与首过代谢过程，用来评估药物的口服生物利用度、首过效应等[72]；肺-肝芯片可以模拟药物吸入后在体内暴露与代谢的过程，多用于研究吸入式物质的代谢[75]；肝-肾芯片多模拟药物在肝脏代谢后，由肾脏进行清除排泄的生理过程[74]。人体芯片常使用来自同一个体的 iPSC 衍生的细胞构建多个器官的芯片，连接尽可能多的核心器官模型，尽量模拟完整的人体生理系统和全身性循环[70]。串联这些器官芯片的主要优势在于可以实现药物吸收、分布、代谢和排泄以及构建基于生理的药代动力学的复杂建模，最终成为药物开发的预测工具[76]。这在预测个体化用药的代谢过程以及个性化医学等领域均有很大的发展前景。

3　新型体外肝脏代谢模型的应用

药物的临床前代谢动力学研究是新药研究的关键部分，它从药物在体内的吸收、分布、代谢和排泄四个方面进行探究。其结果对于指导候选药物的优化、确定毒性试验的剂量和预估人体临床试验的安全剂量来说至关重要[77]。由于前述的肝脏主导体内的代谢过程等原因，开发的新型体外肝脏模型主要应用于其中代谢方面的研究。药物的临床前体外代谢研究的核心内容包括代谢稳定性计算、对代谢物的鉴定[78]，以及 DDI 风险评估。本章节将分别介绍新型体外肝脏代谢模型在这几项研究中的应用现状和前景。

3.1　药物代谢稳定性预测　作为常见的药物代谢动力学（drug metabolism and pharmacokinetics, DMPK）参数，清除率在评估药物的半衰期和生物利用度上都起着关键的作用。在新药开发的早期发现阶段，制药公司通常对体外代谢稳定性进行高通量检测，并以此来预测药物在人体内的清除率[79]。常通过体外人肝微粒体温孵实验或悬浮培养的 PHH 来测定药物的肝内在清除率（$CL_{int,t}$），进而预测人的肝脏清除率（CL）[80]。然而，这样得到的体内肝清除率往往低于临床观察值。其原因在于这些模型的代谢酶表达水平较低，且培养条件无法再现肝脏内复杂的细胞-细胞相互作用。人肝微粒体作为亚细胞组分缺乏细胞质酶和诸多转运蛋白，在代谢稳定性测定中存在局限性[81]。悬浮培养的 PHH 的各代谢酶活性会在 4 h 后迅速下降，因此无法准确预测低清除率的药物的代谢稳定性[82]。此外，悬浮人肝细胞模型因无法区分窦状隙流出和胆管小管排泄而无法单独评估药物的胆汁清除[83]，其供体的差异性也导致其预测的药物代谢数据存在显著的个体差异和批次差异[84]。

现今，为了克服传统模型的缺陷，更精确地测定药物清除率，多种新型体外肝模型被应用于预测药物在人体内的代谢清除率。通过三维培养人肝细胞来延长其代谢酶活性维持时间，是这类模型开发的主要策略之一。譬如，Kanebratt 等用三种不同供体提供的 PHH 培育了球状体模型[36]。不同于悬浮培养的 PHH 会快速丧失重要 CYP450 酶的表达，他们发现该模型的表达维持了 21 d，对于工具药物的内在清除率（CL_{int}）值的测定结果与标准体外肝脏模型相当，且可以测定低清除率药物的代谢清除率。从一项跨模型比较研究的结果中筛选出低清除率药物的数据（Tab.2）。其结果中，低清除率化合物在夹心培养的 HepaRG，随机共培养、悬浮培养、微图案化共培养及球状体培养的 PHH 中的体内清除率预测值分别为 50%、75%、37.5%、50% 和 75% 在两倍误差范围内。该实验结果证明长期稳定的 3D 及工程化体系在预测慢代谢化合物的肝清除率时，整体上较平面或悬浮培养体系具有更小的预测偏差。总之，新型模型的开发有效解决了低清除率药物的代谢清除率测定问题，扩展了原本体外肝模型有限的有效测定范围。

三明治培养的肝细胞模型能够使原代肝细胞重新极化并形成功能性的胆小管网络。同时，该模型培养周期短且对肝细胞消耗较少，因此已成为预测药物胆汁清除率的黄金标准[15]。在 SCH 中，胆汁清除率和胆管外排指数（bile efflux index, BEI）均可通过 B-CLEAR™ 技术来计算并外推预测体内数据，该技术的原理在于形成胆管的模型在无钙离子缓冲液中孵育时，胆管的紧密连接体会被破坏，管腔内的药物扩散进入细胞培养

Tab.2 Prediction fold errors of clearance for low-clearance compounds across different cell systems[85]

Compound	Fold error				
	HepaRG	SCC	Suspension	MPCC	Sph
Diazepam	0.2	0.6	NA	1.1	0.8
Etodolac	0.8	0.7	0.3	0.5	1.6
Glipizide	0.2	0.3	0.8	0.4	0.5
Ketoprofen	0.9	1.6	0.7	2.2	0.9
Ondansetron	1.4	1.0	1.8	2.5	1.8
Theophylline	NA	ND	NA	1.7	3.5
Tolbutamide	ND	1.9	4.9	1.2	2.3
Warfarin	1.3	1.0	NA	2.3	1.4

HepaRG: HepaRG sandwich culture; SCC: Hμrel liver stochastic co-culture; Suspension: spheroid cultures of primary human hepatocytes; MPCC: hepatopac micropatterned co-culture; Sph: micro-array spheroid culture; NA: not applicable; ND: not determined.

液中。而通过含钙和无钙的平衡盐溶液来调节紧密连接，可以区分化合物在细胞和胆小管中的总积累与在细胞内的积累[83]。

此外，由于 PHH 的供应稀缺和批次间差异大，也有一些针对细胞来源进行优化的研究。例如，使用 iPSC 衍生的肝细胞作为细胞来源。尽管 iPSC 的代谢活性被证明通常低于 PHH[86]，但有研究人员在使用肝脏芯片等新型模型培养该细胞后，发现其准确度高于 PHH 的悬浮或平面培养[87]。由此可见 iPSC 衍生的肝细胞具有取代 PHH 作为肝细胞来源的潜力，有待科研界的进一步探究与开发。而被认为是 PHH 的最有力的替代品之一的 HepaRG 细胞，它在平面培养时经诱导分化后测定低清除率化合物时被证明准确度优于悬浮培养的 PHH，但其预测能力不如 HμREL™ 共培养检测法等 PHH 的新型模型[88]。目前，关于 HepaRG 细胞的新型培养模型在代谢清除率预测方面的应用仍较有限。然而，鉴于其易于获取，以及在一定程度上可替代 PHH 进行代谢研究，HepaRG 的新型体外模型具有进一步开发的潜力。

3.2 代谢物鉴定 进行药物的代谢研究时，在明确药物在体内的清除情况之后，接下来将进行药物代谢物鉴定（metabolite identification, Met ID），解析其代谢谱，以识别潜在的活性或有毒代谢物并阐明代谢路径。常见的药物体内代谢物鉴定策略是，首先将药物亚细胞组分共孵育，并进行高通量筛选，以预测潜在的代谢物[89]。而后用 PHH——药物代谢的“金标准”来鉴定实际的代谢光谱，从而预测人体代谢轮廓并指导毒理学物种的选择[90]。不过，如前所述，与体内代谢物相比，亚细胞组分所鉴定的代谢物种类不全[6]。二维培养的肝细胞的药物代谢酶表达谱也具有局限性，且维持肝功能的时间短，同样无法鉴定在体内因母药清除率低而产量极低的代谢物[84]。

相比之下，PHH 球状体在长期培养中能够保持更高且更稳定的Ⅰ相和Ⅱ相代谢活性，使其在代谢研究中优于二维夹心培养的原代人肝细胞[91]。Ohkura 等便评估了人肝细胞球状体在药物代谢的实用性，发现该模型可以检测出常规培养的 PHH 难以检测到的咪达唑仑（midazolam）的 4-羟基代谢物和双氯芬酸（diclofenac）的 4-羟基化和 5-羟基化代谢物，以及具有毒性的酰基葡萄糖醛酸苷结合物[92]。而 HepaRG 细胞球状体也被证明能在 20 d 内维持生理相关的代谢能力，并具备鉴定具有代谢活化潜力的代谢物的能力[93]。作为永生化细胞系，该模型具有较强的可获取性。因此，它具有很大潜力来替代来源有限的 PHH 进行代谢物鉴定研究。

此外，因肝脏芯片对肝细胞在体内生理条件的复制程度更近，有研究人员使用它们对药物进行精确的代谢物鉴定。Docci 等用原代肝细胞构建的肝脏芯片几乎检测到了依法韦仑（efavirenz）

的所有代谢物，包括三级代谢产生的代谢物，证明其可以允许复杂的代谢物鉴定研究[55]。此外，也可以通过调整微流控系统的参数，实现对研究中所需的不同生理条件的模拟。

3.3　药物 DDI 研究　掌握药物在体内的清除情况与代谢物谱后，则可进一步评估药物 DDI，从而对多药并用情形下的临床风险作出更可靠的预测。根据美国 FDA 在 2020 年报告的有关体外模型预测 DDI 的指导原则[94]，药物 DDI 评估通常从体外试验开始，其实验结果能评估新药的 DDI 潜力，为未来的临床 DDI 研究提供依据。其评估内容大致包括：判断药物及其代谢物是否为Ⅰ相和Ⅱ相代谢酶，以及 P-gp、OATP 等体内主要转运体的底物、抑制剂或诱导剂。常用于药物 DDI 研究的体外肝模型包括 PHH，经诱导分化的 HepaRG 细胞[95]以及亚细胞组分[96]。正如其在代谢稳定性和代谢物鉴定中表现出来的局限性一样，在药物 DDI 研究中使用 PHH 传统模型仍会面临转运体和代谢酶活性迅速丧失、供体个体差异大、来源缺乏且昂贵等问题。并且，在传统培养方式下，肝细胞会快速失去细胞极性，几乎不会形成胆管结构，缺乏 BSEP 等关键转运体的表达，导致无法准确评估药物对胆小管转运体的作用[83, 97]。亚细胞组分不具备完整的质膜屏障系统，因此在研究肝细胞质膜上的转运体功能时存在较大局限性[98]。HepaRG 细胞因其来源并非正常肝细胞，在不同药物的 DDI 研究时可能需要不同校正[99]，而这在新药研究中将带来许多限制。

为了克服传统人肝细胞培养代谢酶和转运体活性迅速下降的缺陷，一些新型 PHH 培养模型已被开发应用于 DDI 研究。经验证，ULA 板培养的 PHH 球状体在维持代谢酶和转运体稳定表达的同时，能够作为研究肝脏药物代谢酶和转运蛋白 mRNA 及蛋白诱导的有效体外模型[100]。Ohri 等构建的肝脏芯片中的 PHH 能够长期维持功能和代谢活性，对体外肝脏 DDI 诱导研究同样具有实用性，且适用于长期诱导的研究。这无疑是对体外人肝模型的适用范围的一次突破[101]。SCHH 模型能够维持肝细胞一定时间的代谢酶活性，从而用于评估代谢酶介导的 DDI[102]。此外，该模型所形成的胆小管结构使其能够同时评估肝细胞的摄取、代谢和排泄过程[83]，从而可以在肝胆转运体层面预测 DDI。Pfeifer 便用 SCHH 证明利托那韦（ritonavir）能抑制锝[99m-Tc]甲溴芬宁（^{99m}Tc-mebrofenin）的肝摄取，但不能抑制胆汁排泄。结合基于生理学的药代动力学（physiologically based pharmacokinetic, PBPK）建模，SCHH 便能可靠预测转运体介导的肝脏 DDI[103]。使用 SCHH 模型可以在不预先了解代谢物的情况下，同时评估母体药物与代谢物的效应。因此，该模型适用于研究酶与转运蛋白之间的相互作用，并能更准确地预测肝脏内复杂的 DDI。Fukuda 等便证明虽然坎地沙坦酯（candesartan cilexetil）会对 BSEP 造成抑制作用，但坎地沙坦酯在 SCHH 模型中会代谢为坎地沙坦（candesartan），从而观察不到抑制作用，这种结果更契合临床中 DDI 的实际情况[104]。

为了取代来源有限、批次差异大的 PHH，并尽可能接近新鲜肝细胞的肝功能和生理环境，有较多 iPSC 衍生的肝细胞的新型模型得到开发。iPSC 衍生的肝细胞在超过一周的培养后，其 CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 和 CYP3A4 都表现出较强的被诱导的特性，而其中 2C9 和 2C19 甚至是 PHH 几乎无法评估诱导的[105]。另外，通过从不同个体的 iPSC 衍生成肝细胞组建模型，可以进行包括 DDI 研究在内的个体化代谢研究，或针对特定人群（如患者群体）的 DDI 研究。如 Takayama 建立的能够反映药物反应性个体差异的检测体系，这是由 CYP450 基因个体单核苷酸多态性（single nucleotidepolymorphism, SNP）多样性决定的[106]。而结合肝脏芯片技术，可以构建复杂的相互作用研究条件，增加个体化 DDI 研究的特定性。例如，Lee 等便由同一个供体来源的 iPSC 开发出肝脏-心脏多器官芯片，成功考察了心脏病药物西沙必利（cisapride）与酮康唑（ketoconazole）的相互作用[107]，若使用患者供体的 iPSC 构建出类似的多器官芯片，则对于临床患者用药具有相当大的参考价值，其研究潜力巨大。对于类器官在 DDI 研究中应用的报道较少，这主要受其开发周期长和技术难度大的限制。此外，其检测过程较为复杂，因其培养过程中细胞培养基内的部分培养物（如白蛋白）会对质谱后续测定造成干扰，需要通过基于油膜电泳的电膜萃取（electromembrane extraction, EME）等技术进行分离，以去除干扰物[108]。但鉴于肝类器官相较 iPSC 衍生的肝细

胞更能还原人体内的细胞-细胞相互作用，模拟人体环境，如果能克服和完善培养和检测流程，其在个体化 DDI 研究的潜力同样也很大。除了 iPSC 衍生的肝细胞，采用新型模型的 HepaRG 细胞，如 ULA 板中形成 HepaRG 细胞球状体，在高通量评估药物的 CYP450 酶诱导方面优于平面模型，同样可以在临床前研究时替代 PHH[109]。

4 总结与展望

体外肝脏模型在药物前期代谢研究中被广泛应用。其优势在于伦理可行性高，同时适用于快速筛选和特定代谢研究的需求。近年来，许多新型的体外肝模型被开发出来，例如三明治培养模型、球状体模型、肝脏类器官、肝脏芯片等，同时这些模型也可能结合细胞共培养、微图案化培养等新型培养技术。相较于悬浮培养或二维贴壁培养的传统模型，这些模型在延长代谢酶与转运体活性、还原细胞–细胞相互作用方面表现出明显优势，从而在代谢稳定性、代谢物鉴定与 DDI 评估等方面扩展了体外肝模型的应用范围。此外，新型体外肝模型在个体化医疗方向也具有很大的潜力。iPSC 衍生的肝细胞、患者来源细胞构建的类器官与多器官芯片，为研究遗传多态性、疾病状态对药代动力学的影响提供了可能性。

尽管新型体外肝脏模型具有巨大潜力，但多数仍处于代谢评价领域的探索和完善阶段。这些模型在实际应用中仍存在一些亟待解决的问题。首先是标准化问题。许多三维模型在形态和功能上都比二维培养细胞复杂得多，难以推行统一的系统评估方案。球状体模型在形态、尺寸等三维结构参数方面存在多样性，初始接种密度、氧扩散梯度、培养条件及时间均会影响这些参数，其培养与检测方案、分析输出数据的标准化都受到挑战。基质胶的批次差异、培养过程均会影响肝脏类器官的标准化，影响实验的准确性和可重复性[110]。肝脏芯片中芯片材料的差异、微流控系统的营养交换效率与剪切力差异也会对模型的构建和实验结果的标准化造成影响。其次，新型模型的技术转化与规模化应用面临多重瓶颈。高生理相关性的三维系统与微流控系统通常需要更高的成本与操作复杂度，这与药物早期高通量筛选的需求存在矛盾。同时，复杂体系的批次间变异以及长期培养的稳定性问题，均会影响模型的规模化应用。

综上所述，新型体外肝模型在功能维持与生理相关性方面已展现出显著优势，但要成为代谢评价的常规工具，仍需在标准化、可重复性、节约成本以及监管路径等方面持续突破。我们希望通过总结新型体外肝模型及其在药物代谢研究中的应用现状，能够鼓励更多研究者关注这一领域，并推动新型模型在药物临床前研究乃至个体化药物代谢预测中的应用。此外，这将为药物临床前研究模型的选择提供参考，并支持药物的临床应用。

参考文献

[1] Venkatakrishnan K, Von Moltke LL, Greenblatt DJ. Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models [J]. J Clin Pharmacol, 2001, 41(11): 1149-1179.

[2] Almazroo OA, Miah MK, Venkataramanan R. Drug metabolism in the liver [J]. Clin Liver Dis, 2017, 21(1): 1-20.

[3] Zushin PH, Mukherjee S, Wu JC. FDA Modernization Act 2.0: transitioning beyond animal models with human cells, organoids, and AI/ML-based approaches [J]. J Clin Invest, 2023, 133(21): e273567.

[4] 王颖, 潘国宇. 肝样细胞模型在药物肝脏代谢和毒性研究中的进展 [J]. 药学进展, 2018, 42(8): 581-591.

[5] Li CM, Lu Y, Narayanan R, et al. Drug metabolism and pharmacokinetics of 4-substituted methoxybenzoyl-aryl-thiazoles [J]. Drug Metab Dispos, 2010, 38(11): 2032-2039.

[6] Sowjanya G, Ganapaty S, Sharma R. In vitro test methods for metabolite identification: a review [J]. Asian J Pharm Pharmacol, 2019, 5(4): 441-450.

[7] López-Terrada D, Cheung SW, Finegold MJ, et al. Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line [J]. Hum Pathol, 2009, 40(10): 1512-1515.

[8] Westerink WM, Schoonen WG. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells [J]. Toxicol In Vitro, 2007, 21(8): 1592-1602.

[9] Gripon P, Rumin S, Urban S, et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(24): 15655-15660.

[10] Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, et al. The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for

studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics [J]. Chem Biol Interact, 2007, 168(1): 66-73.

[11] Klein S, Mueller D, Schevchenko V, et al. Long-term maintenance of HepaRG cells in serum-free conditions and application in a repeated dose study [J]. J Appl Toxicol, 2014, 34(10): 1078-1086.

[12] Wilkening S, Stahl F, Bader A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties [J]. Drug Metab Dispos, 2003, 31(8): 1035-1042.

[13] Green CJ, Charlton CA, Wang LM, et al. The isolation of primary hepatocytes from human tissue: optimising the use of small non-encapsulated liver resection surplus [J]. Cell Tissue Bank, 2017, 18(4): 597-604.

[14] Keemink J, Oorts M, Annaert P. Primary Hepatocytes in Sandwich Culture [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1250: 175-188.

[15] Yang K, Guo C, Woodhead JL, et al. Sandwich-cultured hepatocytes as a tool to study drug disposition and drug-induced liver injury [J]. J Pharm Sci, 2016, 105(2): 443-459.

[16] Nakakariya M, Ono M, Amano N, et al. In vivo biliary clearance should be predicted by intrinsic biliary clearance in sandwich-cultured hepatocytes [J]. Drug Metab Dispos, 2012, 40(3): 602-609.

[17] Bi YA, Kimoto E, Sevidal S, et al. In vitro evaluation of hepatic transporter-mediated clinical drug-drug interactions: hepatocyte model optimization and retrospective investigation [J]. Drug Metab Dispos, 2012, 40(6): 1085-1092.

[18] Wu YL, Xue YR, Guo ZT, et al. Furmonertinib (Alflutinib, AST2818) is a potential positive control drug comparable to rifampin for evaluation of CYP3A4 induction in sandwich-cultured primary human hepatocytes [J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43(3): 747-756.

[19] Cox CR, Lynch S, Goldring C, et al. Current perspective: 3D spheroid models utilizing human-based cells for investigating metabolism-dependent drug-induced liver injury [J]. Front Med Technol, 2020, 2: 611913.

[20] Fontoura JC, Viezzer C, Dos Santos FG, et al. Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance [J]. Mater Sci Eng C, 2020, 107: 110264.

[21] Vu B, Souza GR, Dengjel J. Scaffold-free 3D cell culture of primary skin fibroblasts induces profound changes of the matrisome [J]. Matrix Biol Plus, 2021, 11: 100066.

[22] Ho TC, Chang CC, Chan HP, et al. Hydrogels: properties and applications in biomedicine [J]. Molecules, 2022, 27(9): 2829.

[23] Antoine EE, Vlachos PP, Rylander MN. Review of collagen I hydrogels for bioengineered tissue microenvironments: characterization of mechanics, structure, and transport [J]. Tissue Eng Part B Rev, 2014, 20(6): 683-696.

[24] Deng S, Zhu Y, Zhao X, et al. Efficient fabrication of monodisperse hepatocyte spheroids and encapsulation in hybrid hydrogel with controllable extracellular matrix effect [J]. Biofabrication, 2021, 14(1): 015009.

[25] Zhang N, Milleret V, Thompson-Steckel G, et al. Soft hydrogels featuring in-depth surface density gradients for the simple establishment of 3D tissue models for screening applications [J]. SLAS Discov, 2017, 22(5): 635-644.

[26] Lin RZ, Chou LF, Chien CC, et al. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and beta1-integrin [J]. Cell Tissue Res, 2006, 324(3): 411-422.

[27] Foty R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids [J]. J Vis Exp, 2011(51): e2720.

[28] Ryu NE, Lee SH, Park H. Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells [J]. Cells, 2019, 8(12): 1532.

[29] Papapostolou I, Bochen F, Peinelt C, et al. A simple and fast method for the formation and downstream processing of cancer-cell-derived 3D spheroids: an example using nicotine-treated A549 lung cancer 3D spheres [J]. Methods Protoc, 2023, 6(5): 92.

[30] Hurrell T, Ellero AA, Masso ZF, et al. Characterization and reproducibility of HepG2 hanging drop spheroids toxicology in vitro [J]. Toxicol In Vitro, 2018, 50: 86-94.

[31] Ramaiahgari SC, Waidyanatha S, Dixon D, et al. Three-dimensional (3D) HepaRG spheroid model With physiologically relevant xenobiotic metabolism competence and hepatocyte functionality for liver toxicity screening [J]. Toxicol Sci, 2017, 160(1): 189-199.

[32] Shin DS, Seo H, Yang JY, et al. Quantitative evaluation of cytochrome P450 3A4 inhibition and Hepatotoxicity in HepaRG 3-D spheroids [J]. Int J Toxicol, 2018, 37(5): 393-403.

[33] Bell CC, Chouhan B, Andersson LC, et al. Functionality

of primary hepatic non-parenchymal cells in a 3D spheroid model and contribution to acetaminophen hepatotoxicity [J]. Arch Toxicol, 2020, 94(4): 1251-1253.

[34] Baze A, Parmentier C, Hendriks DFG, et al. Three-dimensional spheroid primary human hepatocytes in monoculture and coculture with nonparenchymal cells [J]. Tissue Eng Part C Methods, 2018, 24(9): 534-545.

[35] Proctor WR, Foster AJ, Vogt J, et al. Utility of spherical human liver microtissues for prediction of clinical drug-induced liver injury [J]. Arch Toxicol, 2017, 91(8): 2849-2863.

[36] Kanebratt KP, Janefeldt A, Vilén L, et al. Primary human hepatocyte spheroid model as a 3D In vitro platform for metabolism studies [J]. J Pharm Sci, 2021, 110(1): 422-431.

[37] Huch M, Koo BK. Modeling mouse and human development using organoid cultures [J]. Development, 2015, 142(18): 3113-3125.

[38] Harrison SP, Baumgarten SF, Verma R, et al. Liver organoids: recent developments, limitations and potential [J]. Front Med (Lausanne), 2021, 8: 574047.

[39] Huch M, Dorrell C, Boj SF, et al. In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration [J]. Nature, 2013, 494(7436): 247-250.

[40] Huch M, Gehart H, Van Boxtel R, et al. Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver [J]. Cell, 2015, 160(1-2): 299-312.

[41] Hu H, Gehart H, Artegiani B, et al. Long-Term expansion of functional mouse and human hepatocytes as 3D organoids [J]. Cell, 2018, 175 (6): 1591-1606. e1519.

[42] Huch M, Boj SF, Clevers H. Lgr5 (+) liver stem cells, hepatic organoids and regenerative medicine [J]. Regen Med, 2013, 8(4): 385-387.

[43] Broutier L, Mastrogiovanni G, Verstegen MM, et al. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening [J]. Nat Med, 2017, 23(12): 1424-1435.

[44] Gong D, Mo J, Zhai M, et al. Advances, challenges and future applications of liver organoids in experimental regenerative medicine [J]. Front Med (Lausanne), 2024, 11: 1521851.

[45] Drost J, Clevers H. Translational applications of adult stem cell-derived organoids [J]. Development, 2017, 144(6): 968-975.

[46] Broutier L, Andersson-Rolf A, Hindley CJ, et al. Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation [J]. Nat Protoc, 2016, 11(9): 1724-1743.

[47] Zhu L, Liu S, Wang Z, et al. Modeling hepatic steatosis with human adult stem cell-derived liver organoids [J]. iScience, 2025, 28(5): 112344.

[48] Nantasanti S, Spee B, Kruitwagen HS, et al. Disease modeling and gene therapy of copper storage disease in canine Hepatic organoids [J]. Stem Cell Reports, 2015, 5(5): 895-907.

[49] Ouchi R, Togo S, Kimura M, et al. Modeling Steatohepatitis in humans with pluripotent stem cell-derived organoids [J]. Cell Metab, 2019, 30 (2): 374-384. e376.

[50] Thompson WL, Takebe T. Generation of multi-cellular human liver organoids from pluripotent stem cells [J]. Methods Cell Biol, 2020, 159: 47-68.

[51] Mun SJ, Hong YH, Shin Y, et al. Efficient and reproducible generation of human induced pluripotent stem cell-derived expandable liver organoids for disease modeling [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 22935.

[52] Harrison SP, Siller R, Tanaka Y, et al. Scalable production of tissue-like vascularized liver organoids from human PSCs [J]. Exp Mol Med, 2023, 55(9): 2005-2024.

[53] An L, Liu Y, Liu Y. Organ-on-a-chip applications in microfluidic platforms [J]. Micromachines (Basel), 2025, 16(2): 256.

[54] Kimura H, Sakai Y, Fujii T. Organ/body-on-a-chip based on microfluidic technology for drug discovery [J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2018, 33(1): 43-48.

[55] Docci L, Milani N, Ramp T, et al. Exploration and application of a liver-on-a-chip device in combination with modelling and simulation for quantitative drug metabolism studies [J]. Lab Chip, 2022, 22(6): 1187-1205.

[56] Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME [J]. Arch Toxicol, 2013, 87(8): 1315-1530.

[57] Ma Y, Hu L, Tang J, et al. Three-dimensional cell co-culture liver models and their applications in pharmaceutical research [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(7): 6321.

[58] Caplin JD, Granados NG, James MR, et al. Microfluidic organ-on-a-chip technology for advancement of drug development and toxicology [J]. Adv Healthc Mater, 2015, 4(10): 1426-1450.

[59] Fitzpatrick E, Wu Y, Dhadda P, et al. Coculture with mesenchymal stem cells results in improved viability and function of human hepatocytes [J]. Cell Transplant, 2015, 24(1): 73-83.

[60] Bale SS, Golberg I, Jindal R, et al. Long-term coculture strategies for primary hepatocytes and liver sinusoidal endothelial cells [J]. Tissue Eng Part C Methods, 2015, 21(4): 413-422.

[61] Bale SS, Borenstein JT. Microfluidic cell culture platforms to capture hepatic physiology and complex cellular interactions [J]. Drug Metab Dispos, 2018, 46(11): 1638-1646.

[62] Zhang MY, Lee PJ, Hung PJ, et al. Microfluidic environment for high density hepatocyte culture [J]. Biomed Microdevices, 2008, 10(1): 117-121.

[63] Lopa S, Piraino F, Talò G, et al. Microfluidic biofabrication of 3d multicellular spheroids by modulation of non-geometrical parameters [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 366.

[64] Taroncher M, Gonzalez-Suarez AM, Gwon K, et al. Using microfluidic hepatic spheroid cultures to assess liver toxicity of T-2 mycotoxin [J]. Cells, 2024, 13(11): 1426.

[65] Toh YC, Lim TC, Tai D, et al. A microfluidic 3D hepatocyte chip for drug toxicity testing [J]. Lab Chip, 2009, 9(14): 2026-2035.

[66] 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 Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(16): E2231-E2240.

[67] Liu Y, Li H, Yan S, et al. Hepatocyte cocultures with endothelial cells and fibroblasts on micropatterned fibrous mats to promote liver-specific functions and capillary formation capabilities [J]. Biomacromolecules, 2014, 15(3): 1044-1054.

[68] Busche M, Tomilova O, Schütte J, et al. HepaChip-MP - a twenty-four chamber microplate for a continuously perfused liver coculture model [J]. Lab Chip, 2020, 20(16): 2911-2926.

[69] Sung JH. Pharmacokinetic-based multi-organ chip for recapitulating organ interactions [J]. Methods Cell Biol, 2018, 146: 183-197.

[70] Li ZA, Tuan RS. Towards establishing human body-on-a-chip systems [J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 431.

[71] Milani N, Parrott N, Ortiz Franyuti D, et al. Application of a gut-liver-on-a-chip device and mechanistic modelling to the quantitative in vitro pharmacokinetic study of mycophenolate mofetil [J]. Lab Chip, 2022, 22(15): 2853-2868.

[72] Wang M, 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): 4635-4634.

[73] Schimek K, Frentzel S, Luettich K, et al. Human multi-organ chip co-culture of bronchial lung culture and liver spheroids for substance exposure studies [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 7865.

[74] Lin N, Zhou X, Geng X, et al. Repeated dose multi-drug testing using a microfluidic chip-based coculture of human liver and kidney proximal tubules equivalents [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 8879.

[75] Bovard D, Sandoz A, Luettich K, et al. A lung/liver-on-a-chip platform for acute and chronic toxicity studies [J]. Lab Chip, 2018, 18(24): 3814-3829.

[76] Ishida S. Organs-on-a-chip: Current applications and consideration points for in vitro ADME-Tox studies [J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2018, 33(1): 49-54.

[77] Mak KK, Epemolu O, Pichika MR. The role of DMPK science in improving pharmaceutical research and development efficiency [J]. Drug Discov Today, 2022, 27(3): 705-729.

[78] Wu Y, Pan L, Chen Z, et al. Metabolite identification in the preclinical and clinical phase of drug development [J]. Curr Drug Metab, 2021, 22(11): 838-857.

[79] Chiba M, Ishii Y, Sugiyama Y. Prediction of hepatic clearance in human from in vitro data for successful drug development [J]. AAPS J, 2009, 11(2): 262-276.

[80] 刘晓东. 生理药代动力学模型在创新药物评价中应用及其若干问题的思考 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2021, 26(8): 889-913.

[81] Sodhi JK, Benet LZ. Successful and unsuccessful prediction of human hepatic clearance for lead optimization [J]. J Med Chem, 2021, 64(7): 3546-3559.

[82] Stringer R, Nicklin PL, Houston JB. Reliability of human cryopreserved hepatocytes and liver microsomes as in vitro systems to predict metabolic clearance [J]. Xenobiotica, 2008, 38(10): 1313-1329.

[83] Swift B, Pfeifer ND, Brouwer KL. Sandwich-cultured

hepatocytes: an in vitro model to evaluate hepatobiliary transporter-based drug interactions and hepatotoxicity [J]. Drug Metab Rev, 2010, 42(3): 446-471.

[84] Smith CM, Nolan CK, Edwards MA, et al. A comprehensive evaluation of metabolic activity and intrinsic clearance in suspensions and monolayer cultures of cryopreserved primary human hepatocytes [J]. J Pharm Sci, 2012, 101(10): 3989-4002.

[85] Preiss LC, Georgi K, Lauschke VM, et al. Comparison of human long-term liver models for clearance prediction of slowly metabolized compounds [J]. Drug Metab Dispos, 2024, 52(6): 539-547.

[86] Kratochwil NA, Meille C, Fowler S, et al. Metabolic profiling of human long-term liver models and hepatic clearance predictions from in vitro data using nonlinear mixed-effects modeling [J]. AAPS J, 2017, 19(2): 534-550.

[87] Sakolish C, Luo YS, Valdiviezo A, et al. Prediction of hepatic drug clearance with a human microfluidic four-cell liver acinus microphysiology system [J]. Toxicology, 2021, 463: 152954.

[88] Bonn B, Svanberg P, Janefeldt A, et al. Determination of human hepatocyte intrinsic clearance for slowly metabolized compounds: comparison of a primary hepatocyte/stromal cell co-culture with plated primary Hepatocytes and HepaRG [J]. Drug Metab Dispos, 2016, 44(4): 527-533.

[89] Backfisch G, Reder-Hilz B, Hoeckels-Messemer J, et al. High-throughput quantitative and qualitative analysis of microsomal incubations by cocktail analysis with an ultraperformance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometer system [J]. Bioanalysis, 2015, 7(6): 671-683.

[90] Negi CK, Sakolish C, Tsai HH, et al. Comparative analysis of species-specific hepatocyte function and drug effects in a liver microphysiological system physioMimix LC12 and 96-well plates [J]. ACS Pharmacol Transl Sci, 2025.

[91] Bell CC, Dankers ACA, Lauschke VM, et al. Comparison of Hepatic 2D sandwich cultures and 3D spheroids for long-term toxicity applications: a multicenter study [J]. Toxicol Sci, 2018, 162(2): 655-666.

[92] Ohkura T, Ohta K, Nagao T, et al. Evaluation of human hepatocytes cultured by three-dimensional spheroid systems for drug metabolism [J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2014, 29(5): 373-378.

[93] Ramaiahgari SC, Waidyanatha S, Dixon D, et al. From the cover: three-dimensional (3D) HepaRG spheroid model with physiologically relevant xenobiotic metabolism competence and hepatocyte functionality for liver toxicity screening [J]. Toxicol Sci, 2017, 159(1): 124-136.

[94] U. S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry; In vitro drug interaction studies - Cytochrome P450 enzyme and transportermediated drug interactions [EB/OL]. 2020 [2025-10-20]. https://www.fda.gov/media/134582/download.

[95] Fujita Y, Miyake T, Shao X, et al. Omeprazole induces CYP3A4 mRNA expression but not CYP3A4 protein expression in HepaRG cells [J]. Biol Pharm Bull, 2024, 47(6): 1218-1223.

[96] Obach RS, Walsky RL, Venkatakrishnan K, et al. The utility of in vitro cytochrome P450 inhibition data in the prediction of drug-drug interactions [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 316(1): 336-348.

[97] Kaur I, Vasudevan A, Rawal P, et al. Primary hepatocyte isolation and cultures: technical aspects, challenges and advancements [J]. Bioengineering (Basel), 2023, 10(2): 245.

[98] Wegler C, Matsson P, Krogstad V, et al. Influence of proteome profiles and intracellular drug exposure on differences in CYP activity in donor-matched human liver microsomes and hepatocytes [J]. Mol Pharm, 2021, 18(4): 1792-1805.

[99] Sison-Young RL, Mitsa D, Jenkins RE, et al. Comparative proteomic characterization of 4 human liver-derived single cell culture models reveals significant variation in the capacity for drug disposition, bioactivation, and detoxication [J]. Toxicol Sci, 2015, 147(2): 412-424.

[100] Järvinen E, Hammer HS, Pötz O, et al. 3D spheroid primary human hepatocytes for prediction of cytochrome P450 and drug transporter induction [J]. Clin Pharmacol Ther, 2023, 113(6): 1284-1294.

[101] Ohri S, Parekh P, Nichols L, et al. Utilization of a human Liver tissue chip for drug-metabolizing enzyme induction studies of perpetrator and victim drugs [J]. Drug Metab Dispos, 2025, 53(1): 100004.

[102] Zhang Z, Farooq M, Prasad B, et al. Prediction of gestational age-dependent induction of in vivo hepatic CYP3A activity based on HepaRG cells and human hepatocytes [J]. Drug Metab Dispos, 2015, 43(6): 836-842.

[103] Pfeifer ND, Goss SL, Swift B, et al. Effect of Ritonavir

on (99m) technetium-mebrofenin disposition in humans: A semi-pbpk modeling and in vitro approach to predict transporter-mediated DDIs [J]. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol, 2013, 2(1): e20.

[104] Fukuda H, Nakanishi T, Tamai I. More relevant prediction for in vivo drug interaction of candesartan cilexetil on hepatic bile acid transporter BSEP using sandwich-cultured hepatocytes [J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2014, 29(1): 94-96.

[105] Murayama N, Yamazaki H. Cytochrome P450-dependent drug oxidation activities in commercially available hepatocytes derived from human induced pluripotent stem cells cultured for 3 weeks [J]. J Toxicol Sci, 2018, 43(4): 241-245.

[106] Takayama K, Morisaki Y, Kuno S, et al. Prediction of interindividual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(47): 16772-16777.

[107] Lee-Montiel FT, Laemmle A, Charwat V, et al. Integrated isogenic human induced pluripotent stem cell-based liver and heart microphysiological systems predict unsafe drug-drug interaction [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 667010.

[108] Skottvoll FS, Hansen FA, Harrison S, et al. Electromembrane extraction and mass spectrometry for liver organoid drug metabolism studies [J]. Anal Chem, 2021, 93(7): 3576-3585.

[109] Ott LM, Ramachandran K, Stehno-Bittel L. An automated multiplexed hepatotoxicity and CYP induction assay using heparg cells in 2D and 3D [J]. SLAS Discov, 2017, 22(5): 614-625.

[110] 孙广晨, 李宏宇, 陈江, 等. 类器官在生物医学中研究进展及应用 [J]. 临床军医杂志, 2023, 51(11): 1206-1210.

Novel *in vitro* liver metabolism models and their applications progress

LU Sihan[1,2], BAO Guanglin[1,2], SUN Jianguo[1,2,3]

[1] Jiangsu Provincial Key Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, Jiangsu, China; [2] State key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, Jiangsu, China; [3] Innovative Unit "PK-PD Combination Research on Complex Components of Traditional Chinese Medicines", Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

ABSTRACT Studies of hepatic drug metabolism are crucial for drug development, clinical dosing guidance, and assessment of drug safety. Although traditional *in vitro* liver models have been widely used, their limitations in maintaining hepatic function, predictive accuracy, and physiological fidelity have spurred the development of various advanced *in vitro* liver models. Previous reviews have focused on the technologies used for constructing novel models or on comparative evaluations of their performance, whereas systematic analyses of the application characteristics of different advanced models in drug metabolism research remain limited. Based on a comprehensive review of recent advanced *in vitro* liver models and the novel technologies they employ, this article further aligns model functional characteristics with specific drug-metabolism research scenarios and summarizes their performance in metabolic stability assessment, metabolite identification, and the evaluation of drug–drug interactions. This review aims to provide guidance for the rational selection and standardized application of *in vitro* models, thereby supporting preclinical research and clinical use of drugs.

KEYWORDS liver; biotransformation; *in vitro* techniques; metabolic clearance rate; drug interaction