ICS 11.120
CCS C 27

T/CICC

中 国 指 挥 与 控 制 学 会 团 体 标 准

T/CICC 28001—2026

脑类器官芯片通用规范

General Specification for Brain Organoid-on-Chip Systems

2026-**-**发布　　2026-**-**实施

中国指挥与控制学会　发布

目　次

前言 V
1 范围 1
2 规范性引用文件 1
3 术语和定义 1
4 缩略语 4
5 原理 5
6 技术要求 5
6.1 脑类器官-芯片培养体系要求 5
6.1.1 细胞来源与质量 5
6.1.2 培养基与试剂 5
6.1.3 基质材料与芯片器件 6
6.1.4 类器官成熟度与均一性 6
6.1.5 类器官活力 6
6.2 受试药物样品要求 6
6.2.1 通用要求 6
6.2.2 化学药物 6
6.2.3 生物药物（多肽、蛋白、抗体等） 7
6.2.4 中药受试物（特殊类别） 7
6.3 实验环境及仪器设备要求 7
6.3.1 实验环境 7
6.3.2 仪器设备 7
6.3.3 实验动物（用于含药血清制备） 7
6.4 伦理与生物安全要求 7
7 脑类器官芯片制备 8
7.1 人多能干细胞来源脑类器官 8
7.1.1 培养方案选择 8
7.1.2 培养流程 8
7.1.3 培养条件控制 8
7.2 组织来源脑类器官 8
7.2.1 疾病模型类器官 8
7.2.2 基因编辑细胞系制备 9
7.3 脑类器官芯片组装 9

7.4 脑类器官质量鉴定 9
7.4.1 形态学鉴定 9
7.4.2 细胞组成鉴定 9
7.4.3 功能鉴定 9
8 受试药物样品制备 10
8.1 通用制备要求 10
8.2 化学药物制备 10
8.2.1 小分子化学药物 10
8.3 生物药物制备（多肽、蛋白、抗体、细胞因子类） 10
8.4 中药受试物 11
8.4.1 中药提取物制备 11
8.4.2 含药血清制备 11
8.4.3 中药复方制剂制备 12
8.4.4 其他中药吸收代谢途径制备 12
9 药效评价方法 13
9.1 通则 13
9.1.1 实验设计 13
9.1.2 干预时长 13
9.2 形态学评价 13
9.2.1 宏观形态观察 13
9.2.2 组织学染色 13
9.2.3 免疫组织化学/免疫荧光染色 13
9.3 细胞活力与毒性评价 14
9.3.1 CCK-8 法检测细胞代谢活性 14
9.3.2 活/死细胞染色 14
9.3.3 LDH 释放实验 14
9.3.4 细胞凋亡检测 14
9.4 神经发育与分化评价 14
9.4.1 神经发生评价 14
9.4.2 神经元成熟与突触形成评价 15
9.4.3 皮层分层与区域特异性评价 15
9.5 神经电生理功能评价 15
9.5.1 钙成像 15
9.5.2 多电极阵列（MEA）记录 15

9.5.3 膜片钳记录 15
9.6 神经炎症与免疫评价 16
9.6.1 小胶质细胞活化评价 16
9.6.2 炎症因子检测 16
9.6.3 炎症信号通路检测 16
9.7 血脑屏障功能评价 16
9.7.1 血管化脑类器官模型构建 16
9.7.2 跨内皮电阻（TEER）测定 16
9.7.3 通透性实验 16
9.7.4 紧密连接蛋白检测 17
9.8 线粒体功能评价 17
9.8.1 线粒体膜电位检测 17
9.8.2 ATP 含量测定 17
9.8.3 线粒体形态与分布 17
9.8.4 线粒体呼吸功能 17
9.9 氧化应激评价 17
9.9.1 活性氧（ROS）检测 17
9.9.2 抗氧化酶活性检测 17
9.9.3 氧化损伤标志物检测 17
9.9.4 抗氧化能力检测 18
10 评价指标体系与结果判定 18
10.1 评价指标体系 18
10.2 结果判定原则 18
10.2.1 有效判定 19
10.2.2 无效判定 19
10.2.3 毒性判定 19
10.2.4 综合评价 19
11 质量控制 19
11.1 对照设置 19
11.2 重复性要求 19
11.3 盲法要求 20
11.4 批次记录 20
11.5 类器官质量监控 20
12 数据处理与统计分析 20

12.1 数据预处理 20
12.2 统计方法选择 20
12.3 多重比较校正 21
12.4 效应量与置信区间 21
12.5 统计显著性水平 21
12.6 量效关系分析 21
13 结果报告 21
13.1 报告内容 21
13.2 图表要求 22
13.3 结论表述 22
13.4 局限性说明 22
附录 A（资料性） 脑类器官培养关键参数 23
附录 B（资料性） 中枢药物药效评价典型疾病模型 25
附录 C（资料性） 主要仪器设备与试剂 27
附录 D（资料性） 评价指标检测方法详则 29
参考文献 31

前　言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国指挥与控制学会提出并归口。

本文件起草单位：中国中医科学广安门医院、中国医学科学院药物研究所、中国中医科学院西苑医院、中国中医科学院健康产业研究所、中国科学院国家纳米科学中心等。

本文件主要起草人：陈鹏、马涛、李一帆、尚凤娜、崔钊、黎彩凤、李嘉萌、曹旭霞。

脑类器官芯片通用规范

1 范围

本文件规定了基于脑类器官芯片模型开展中枢神经系统药物药效评价的技术要求、实验方法、评价指标、质量控制、数据处理与结果报告等内容。

本文件适用于化学药、生物药、中药（中药复方、中药提取物及中药单体化合物）作用于中枢神经系统相关疾病的脑类器官芯片药效评价研究，包括但不限于：

神经退行性疾病，如阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、肌萎缩侧索硬化症等；

血管疾病，如脑缺血、脑出血及其后遗症等；

神经发育障碍，如自闭症谱系障碍、唐氏综合征、瑞特综合征等；

神经精神疾病，如抑郁症、焦虑症、精神分裂症等；

神经损伤与修复，如创伤性脑损伤、脊髓损伤等。

本文件适用于上述药物的脑类器官芯片药效评价研究，也可为相关药物新药注册申报提供非临床药效学参考。

本文件不适用于注射剂的体内全身毒性评价，也不单独作为注射剂安全性判定依据。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 1.1-2020 标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则

GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测

GB/T 35828-2018 中药材及饮片检测实验室管理规范

GB 50457-2019 医药工业洁净厂房设计标准

GB 50591-2010 洁净室施工及验收规范

ICH M3(R2) 药物非临床安全性研究指南

ICH S7A 人用药物安全药理学研究

ISO 10993-5:2009 医疗器械生物学评价 第 5 部分：体外细胞毒性试验

ISO 20387:2018 生物技术 生物样本库 通用要求

T/CSCB 0001-2020 干细胞通用要求

T/CACM 1021.1-2016 中药材商品规格等级 第 1 部分：标准编制通则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

脑类器官 brain organoid

由人多能干细胞或神经前体细胞在三维培养条件下自组织形成的微型体外组织。其内部可包含神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞和小胶质细胞，形成层状结构和突触连接，并表现出电生理活动。

3.2

脑类器官芯片 brain organoid-on-chip

将脑类器官整合至微流控芯片腔室，可实现流体动态灌注、共培养、原位检测的体外器官芯片系统，用于药物药效、屏障功能、毒性评价。

3.3

动态灌注 dynamic perfusion

通过微流控芯片管路持续或间歇输送培养基、受试物，模拟体内组织流体微环境的流体培养模式。

3.4

静态培养 static culture

类器官置于普通培养板中，无芯片流体驱动，依靠被动扩散完成物质交换的体外培养模式。

3.5

受试物 test substance

本文件中指用于脑类器官芯片评价的化学药、生物药、中药等各类待测试物质。

3.6

药物药效评价 efficacy evaluation of drug

在受控实验条件下，采用生物学方法对药物防治疾病的作用效果进行定性或定量评估。

3.7

含药血清 drug-containing serum

实验动物经受试药物给药后，在规定时间采集的血清。血清中含有药物原形成分、代谢产物及给药后机体产生的内源性活性物质。直接用于体外实验时，虽不能完整再现体内环境，但可部分反映药物在体内的综合效应；该方法多用于中药等成分复杂受试物的体外评价。

3.8

神经分化 neural differentiation

干细胞或神经祖细胞在特定信号分子和培养条件下，逐步分化为神经元、星形胶质细胞或少突胶质细胞等成熟神经细胞的过程。

3.9

血脑屏障模型 blood-brain barrier model

在脑类器官芯片培养体系中，由血管内皮细胞、周细胞及星形胶质细胞终足共同构建的体外结构，可模拟体内血脑屏障的选择性通透功能。

3.10

电生理功能 electrophysiological function

脑类器官中神经元及神经网络产生的自发性或诱发性电活动，如动作电位、突触后电位、簇发放和网络振荡。这类活动反映神经网络的成熟程度和功能状态。

3.11

诱导多能干细胞 induced pluripotent stem cell；iPSC

通过向体细胞导入特定转录因子（如 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 等）重编程而获得的干细胞，具有多向分化潜能。由患者体细胞制备的 iPSC 可用于构建疾病特异性脑类器官。

3.12

类器官成熟度 organoid maturity

脑类器官在培养过程中所达到的发育阶段。评估时需综合考虑培养天数、细胞类型组成、基因表达谱、形态结构及功能活性。

3.13

药物干预窗口 drug intervention window

在疾病模型脑类器官芯片中，从造模成功到出现不可逆病理改变之间的时间段。在此期间给予药物，可区分其预防作用和治疗作用。

4 缩略语

Aβ β-淀粉样蛋白（amyloid-β）

BDNF 脑源性神经营养因子（brain-derived neurotrophic factor）

CCK-8 细胞计数试剂盒-8（cell counting kit-8）

DMSO 二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide）

EB 胚体（embryoid body）

ELISA 酶联免疫吸附测定（enzyme-linked immunosorbent assay）

GFAP 胶质纤维酸性蛋白（glial fibrillary acidic protein）

hiPSC 人诱导多能干细胞（human induced pluripotent stem cell）

hESC 人胚胎干细胞（human embryonic stem cell）

LDH 乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase）

MAP2 微管相关蛋白 2（microtubule-associated protein 2）

MEA 多电极阵列（microelectrode array）

OGD 氧糖剥夺（oxygen-glucose deprivation）

PBS 磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline）

qPCR 定量聚合酶链式反应（quantitative polymerase chain reaction）

ROS 活性氧（reactive oxygen species）

SPF 无特定病原体（specific pathogen free）

TEER 跨上皮/内皮电阻（transendothelial/epithelial electrical resistance）

TUNEL 末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记（terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling）

β-III Tubulin β-III 微管蛋白，神经元早期标志物

AHP 层次分析法（Analytic Hierarchy Process）

5 原理

脑类器官由人多能干细胞在三维环境中自组织形成，在体外复现神经发生、神经元迁移和突触形成等发育事件。将脑类器官整合至微流控芯片构建脑类器官芯片，可引入流体动态培养条件，进一步模拟体内脑组织微环境。与二维培养不同，三维结构使神经元与星形胶质细胞等形成空间上的真实接触，细胞间通讯也更接近体内状态。这种结构上的优势，使药物作用的评价结果更具参考价值。

在疾病模型或正常发育模型脑类器官芯片上施加受试药物样品，通过形态学、细胞活力、电生理及炎症因子等指标，观察其在神经保护、神经再生等方面的作用。所得数据可用于药效筛选和作用机制研究。

技术路线分为模型与芯片构建、药物干预、药效评价、质量控制和数据分析五个阶段。每个阶段都设置了具体的操作参数和判定标准，以减少实验间差异。

6 技术要求

6.1 脑类器官-芯片培养体系要求

6.1.1 细胞来源与质量

a）应使用经质量检定合格的人多能干细胞（hESCs 或 hiPSCs）或神经前体细胞。细胞系来源应明确，优先选用已建立的标准化细胞系，如 H9、H1 等 hESC 细胞系，或经过充分表征的健康供体来源 hiPSC 细胞系。

b）细胞系应完成以下质量检测：核型分析正常；多能性标志物 Oct4、Sox2、Nanog 阳性率≥95%；具备三胚层分化能力；微生物检测（细菌、真菌、支原体）阴性；人源病原体检测（HIV、HBV、HCV）阴性（适用于 hiPSC）。

c）细胞代次应控制在 P25 代以内，每次实验应记录细胞代次及冻存批次。

6.1.2　培养基与试剂

a）培养基应采用化学成分明确的无血清培养体系或经优化的含血清替代物培养体系。

b）培养基主要成分应包括：基础培养基（DMEM/F12、Neurobasal 等）、N2 补充剂、B27 补充剂、神经生长因子（BDNF、GDNF、NT-3 等）、小分子化合物（SB431542、Dorsomorphin、CHIR99021 等）及抗凋亡因子。

c）所有试剂应记录生产厂家、货号、批号及有效期，培养基应现配现用或分装保存于 -20℃ 以下。

6.1.3　基质材料与芯片器件

a）用于类器官包埋和培养的基质材料可采用 Matrigel、Geltrex 等天然基质胶，或采用化学成分明确的合成水凝胶。

b）天然基质胶应使用低生长因子版本，批间差异应通过预实验验证，同一批次实验应使用同一批次基质胶。

c）微流控芯片器件应无细胞毒性；芯片腔室尺寸适配脑类器官尺寸；配套灌注设备可实现流速稳定的动态流体培养。

d）PDMS 材质芯片需注意小分子药物吸附，必要时进行封闭预处理。

6.1.4　类器官成熟度与均一性

a）用于药效评价的脑类器官应达到相应实验所需的发育阶段。一般基础研究建议使用培养第 30-60 天的类器官；电生理功能评价建议使用培养第 60-120 天的类器官；疾病建模应根据具体模型要求确定。

b）类器官直径应在 300 μm-800 μm 范围内，同一批次内直径变异系数（CV）应不大于 20%。

c）类器官形态应呈类球形或椭球形，表面可见清晰的神经上皮结构，无明显坏死核心（坏死面积占比≤10%）。

6.1.5　类器官活力

a）实验前应采用 Calcein-AM/PI 双染色法检测活/死细胞比例，活细胞比例应不低于 80%。

b）类器官代谢活性应采用 CCK-8 或 Alamar Blue 法检测，吸光度值应在正常范围内。

6.2　受试药物样品要求

6.2.1　通用要求

a）受试药物应具备完整来源信息、批号，提供纯度/活性、结构或组分相关证明资料。

b）选择合适溶剂进行溶解，DMSO 作为助溶剂时，体系终浓度不应超过 0.1%。

c）所有受试样品使用前应经 0.22 μm 滤膜过滤除菌；避免样品反复冻融。

d）开展芯片动态灌注给药时，应评估受试物在芯片、管路材料上的吸附效应，必要时校正实际给药浓度。

e）正式药效实验前应开展浓度梯度预实验，确定无显著毒性的有效给药区间。

6.2.2　化学药物

a）小分子化学药物应提供纯度检测图谱（HPLC 或 GC），一般纯度不低于 98%，提供结构确证资料。

b）明确溶解条件、储存条件，母液建议分装冻存。

6.2.3　生物药物（多肽、蛋白、抗体等）

a）应提供受试物纯度、生物活性、内毒素检测结果，明确储存条件。

b）蛋白类受试物易发生材料吸附，芯片给药前宜开展吸附验证，必要时对管路进行封闭预处理。

6.2.4　中药受试物（特殊类别）

说明：中药为受试药物中的一类，具有组分复杂、多靶点特点，除满足 6.2.1 通用要求之外，还应符合以下附加要求：

a）中药材、饮片应符合《中华人民共和国药典》相关规定，具备基原、产地、加工、安全性检测（重金属、农残、黄曲霉毒素）记录。

b）中药提取物、复方样品应明确制备工艺，提供得率、质量控制信息（指纹图谱或指标成分含量）。

c）必要时可采用含药血清方式开展体外评价，含药血清制备应使用 SPF 级实验动物，规范给药、采血、灭活、除菌、分装保存流程。

d）中药单体参照 6.2.2 化学药物相关要求执行。

6.3　实验环境及仪器设备要求

6.3.1　实验环境

a）细胞培养操作应在符合 GB 50457 要求的 B 级背景下的 A 级生物安全柜（II 级 A2 型）中进行。

b）实验室应配备独立的细胞培养室、分子生物学实验室及成像分析室，避免交叉污染。

c）实验室温湿度应控制在 20℃~26℃、相对湿度 30%~70%。

6.3.2　仪器设备

a）主要仪器设备应经计量检定或校准合格，在有效期内使用。

b）CO2 培养箱应定期校准温度（37±0.5℃）和 CO2 浓度（5±0.2%），并记录。

c）分析天平、离心机、酶标仪、PCR 仪等定量检测设备应定期进行性能验证。

d）显微镜成像系统应定期校准标尺及荧光强度。

6.3.3　实验动物（用于含药血清制备）

本部分仅用于含药血清制备，多用于中药复杂受试物的评价。

a）应使用 SPF 级实验动物，动物来源及质量合格证应齐全。

b）动物饲养环境应符合 GB 14925 要求，温度 20℃-26℃，相对湿度 40%-70%，12 h 光照/黑暗循环。

6.4　伦理与生物安全要求

a）人多能干细胞来源应符合国内生物伦理相关管理规定，细胞来源可追溯；禁止使用来源不明的人源细胞；

b）所有细胞、生物样本废弃物按照生物安全实验室要求处置；

c）本标准仅用于体外科研评价，不用于人体诊断、治疗。

7　脑类器官芯片制备

7.1　人多能干细胞来源脑类器官

7.1.1　培养方案选择

所用干细胞材料应经过伦理审查，具备伦理审批文件。

a）可采用经典 Sasai 类器官培养方案、Lancaster 改良方案或其他经充分验证的脑类器官培养方案。

b）根据实验目的选择全脑类器官（whole-brain organoid）或区域特异性脑类器官（region-specific organoid），如大脑皮层类器官、中脑类器官、海马类器官等。

7.1.2　培养流程

a）第 0 天（D0）：人多能干细胞消化成单细胞，以每孔 10000-15000 个细胞接种于低吸附 U 底 96 孔板，加入含 ROCK 抑制剂（Y-27632，10 μM）的 EB 形成培养基，促进胚体（embryoid body, EB）形成。

b）第 1-5 天（D1~D5）：更换为神经诱导培养基（含 DMEM/F12、N2、B27、SB431542 10 μM、Dorsomorphin 2 μM），诱导外胚层分化及神经上皮形成。每日观察 EB 形态，理想的神经上皮结构应表现为光滑、明亮的玫瑰花环样结构。

c）第 6-10 天（D6~D10）：将 EB 包埋于 Matrigel 滴中，转入神经分化培养基（含

Neurobasal、B27、N2、BDNF 20 ng/mL、GDNF 20 ng/mL），促进神经上皮扩张及脑区特化。Matrigel 包埋时应控制滴体积在 30-50 uL，避免包埋过深影响营养交换。

d）第 11 天以后（D11+）：将 Matrigel 包埋的类器官转移至旋转生物反应器或轨道摇床培养瓶中，进行长期悬浮培养。培养基每 2~3 天更换一次，培养条件为 37℃、5% CO2、饱和湿度。轨道摇床转速根据培养容器调整，一般为 60-90 rpm。

7.1.3　培养条件控制

a）培养基更换频率：悬浮培养阶段每 2-3 天更换 50%~80%体积的新鲜培养基。

b）溶氧控制：旋转培养时应保证充分的气体交换，避免类器官中心缺氧坏死。

c）pH 监测：培养基颜色变化可作为 pH 变化的初步指示，偏酸性时应及时更换培养基。

7.2　组织来源脑类器官

7.2.1　疾病模型类器官

a）可采用患者来源 iPSCs（patient-derived iPSCs）或携带疾病相关基因突变的基因编辑细胞系。

b）常见疾病模型包括：阿尔茨海默病（APP、PSEN1/2 突变）、帕金森病（LRRK2、SNCA 突变）、亨廷顿病（HTT 基因 CAG 重复扩增）、自闭症（SHANK3、MECP2 突变）等。

c）疾病模型类器官应经过基因型验证（Sanger 测序或 NGS）及表型确证（如 AD 模型中 Aβ沉积、Tau 过度磷酸化等）。

7.2.2　基因编辑细胞系制备

a）可采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在野生型 hPSCs 中引入或修正疾病相关突变。

b）基因编辑后应进行单克隆筛选、基因型鉴定及脱靶效应评估。

7.3　脑类器官芯片组装

芯片组装全过程应在无菌条件下完成。

a）选择经质量鉴定合格的脑类器官，放置于微流控芯片腔室内；可使用基质胶适度固定；

b）完成管路连接，设置灌注流速，开展预平衡；动态灌注体系预平衡时间 4 h-12 h；

c）构建血脑屏障共培养模型时，按照方案接种内皮细胞、周细胞、星形胶质细胞，直至 TEER 达到合格指标后再开展药物干预。

7.4　脑类器官质量鉴定

用于药物评价的脑类器官，应完成形态、细胞组成、功能鉴定，达到附录 A 参考要求，

方可用于后续芯片组装与药物评价；未达标的类器官应当舍弃，不得用于药效实验。

7.4.1　形态学鉴定

a）倒置显微镜观察类器官整体形态，记录直径、圆度、表面光滑度及有无坏死区域。

b）冰冻切片或石蜡切片后进行 HE 染色，观察内部细胞密度、层状结构及坏死核心。

7.4.2　细胞组成鉴定

a）免疫荧光染色检测主要细胞类型标志物：神经元（Tuj1、MAP2、NeuN）、星形胶质细胞（GFAP、S100beta）、少突胶质细胞（O4、MBP）、神经前体细胞（Sox2、Nestin、Pax6）。

b）定量分析各细胞类型比例，成熟脑类器官中神经元比例一般不低于 30%，星形胶质细胞比例在 10%-40%范围内。

7.4.3　功能鉴定

a）钙成像检测自发性钙活动，观察有无同步化钙波。

b）MEA 记录自发电活动，检测放电频率及簇发放特征。

8　受试药物样品制备

8.1　通用制备要求

a）受试药物配制所用溶剂、培养基、耗材应无细胞毒性，溶剂优先选用培养基、PBS；DMSO 作为助溶剂时，体系终浓度不应大于 0.1%，应设置对应溶剂对照组。

b）所有受试工作液使用前均应经 0.22 μm 滤膜过滤除菌；遇蛋白、大分子受试物，选用低蛋白吸附滤膜。

c）母液应分装成小体积，避免反复冻融；按照受试物理化性质选择避光、-20 ℃或-80 ℃条件保存，标注配制日期、有效期。

d）正式药效实验前，应开展浓度梯度预实验，确定无显著毒性的有效给药区间；细胞活力下降大于 20%的浓度不宜用于药效评价。

e）采用脑类器官芯片动态灌注给药时，应评估受试物在芯片管路、腔室材料上的吸附损耗，必要时通过预实验校正实际给药浓度；易吸附受试物可对管路做封闭预处理。

f）配制全过程记录受试物批号、溶剂、配制时间、操作人员、储存条件。

8.2　化学药物制备

8.2.1　小分子化学药物

a）母液配制：根据化合物溶解性选择合适溶剂；水溶性小分子优先使用无菌 PBS 或基础培养基；脂溶性小分子使用 DMSO 配制高浓度母液，母液浓度建议 10 mM-100 mM。

b）溶解操作：固体受试物称量后先加入溶剂充分涡旋、静置，必要时低温超声助溶，

保证完全溶解，无肉眼可见沉淀。

c）母液分装与保存：母液分装为单次使用体积，-20 ℃避光冻存；避免反复冻融，冻融次数不宜超过 3 次；出现沉淀、变色应废弃。

d）工作液配制：实验当日，用完全培养基对母液进行逐级稀释，禁止高浓度母液直接加入培养基，防止局部析出沉淀；严格控制 DMSO 终浓度≤0.1%。

e）纯度与杂质控制：受试物应提供 HPLC/GC 纯度图谱，纯度一般不低于 98%；关注残留有机溶剂，溶剂残留不得产生细胞毒性。

f）芯片给药：动态灌注体系下，配制与灌注培养基组分保持一致，避免渗透压、pH 大幅波动；必要时检测流出液药物浓度，校正吸附损失。

8.3　生物药物制备（多肽、蛋白、抗体、细胞因子类）

a）复溶：严格按照产品说明书推荐溶剂、蛋白浓度进行复溶；禁止剧烈涡旋，采用轻柔颠倒混匀，防止蛋白变性聚集；冻干样品复溶后静置，去除泡沫。

b）母液分装保存：复溶后分装为单次使用小体积，-80 ℃保存，避免反复冻融，冻融次数不超过 2 次；不可-20 ℃长期存放蛋白类样品。

c）工作液配制：使用无蛋白吸附管路与耗材；用完全培养基稀释至目标工作浓度，现配现用，室温放置时间不宜超过 2 h。

d）质量控制：受试物应提供纯度、生物活性、内毒素检测报告；内毒素水平应满足体外细胞实验要求，避免内毒素诱导非特异性炎症反应干扰药效结果。

e）芯片给药特殊要求：蛋白类物质易吸附于 PDMS 等微流控芯片材料表面。给药前宜使用 BSA 或培养基对芯片管路、腔室进行封闭预处理；通过检测流出液蛋白浓度确定实际给药浓度，校正吸附损耗；降低流速波动，减少蛋白剪切变性。

f）渗透压与 pH：配制完成后确认工作液 pH、渗透压与细胞培养基接近，避免渗透压应激损伤脑类器官。

8.4　中药受试物

中药属于受试药物中的特殊类别，组分复杂、多靶点作用，除满足 8.1 通用制备要求外，提取物、复方、含药血清可按本小节执行；中药单体化合物按照 8.2 化学药物制备要求执行。

8.4.1　中药提取物制备

8.4.1.1　提取方法

a）水提法：药材粗粉以 8~12 倍量蒸馏水浸泡 30 min 后加热回流提取 1-2 h，提取 1-3 次，合并提取液，过滤，减压浓缩，冷冻干燥或喷雾干燥。

b）醇提法：药材粗粉以 60%~80%乙醇为溶剂，料液比 1:8-1:12，加热回流提取 1-2 h，提取 1-3 次，合并提取液，过滤，回收乙醇，减压浓缩，冷冻干燥。

c）超临界 CO_2萃取：适用于脂溶性成分的提取，萃取压力 20~40 MPa，温度 35~55 ℃，CO_2流量 10-30 kg/h，萃取时间 1-3 h。

d）其他方法：根据药材性质和有效成分特点，可采用超声波辅助提取、微波辅助提取、酶解提取等方法。

8.4.1.2　提取物处理与保存

a）提取物干燥后应粉碎过筛（一般过 80 目筛），密封保存于-20 ℃ 以下，避免光照和潮湿。

b）使用前以培养基或适当溶剂（DMSO、PBS 等）溶解，DMSO 终浓度不应超过 0.1%。

c）提取物溶液应经 0.22 μm 滤膜过滤除菌，现配现用，避免反复冻融。

8.4.2　含药血清制备

a）含药血清为中药复杂受试物可选择的评价手段，并非强制采用。

b）开展动物实验应遵守实验动物伦理相关管理规定，获得相应伦理审批。

8.4.2.1　实验动物选择

a）首选 SPF 级 SD 大鼠（体重 180-220 g，雄性）或昆明种小鼠（体重 18-22 g，雄性），也可根据研究需要选用其他品系。

b）动物应在实验环境中适应饲养 3~7 天，确认健康状况良好后方可用于实验。

8.4.2.2　给药方案

a）给药剂量：参照临床等效剂量，按体表面积换算，设置高、中、低三个剂量组及空白对照组。高剂量一般不超过临床等效剂量的 5 倍，低剂量不低于临床等效剂量的 1/5。

b）给药途径：首选灌胃给药，也可根据中药剂型特点选择腹腔注射或静脉注射。

c）给药频次：每日 1-2 次，连续给药 3-7 天。

8.4.2.3　血清采集与处理

a）末次给药后 1-2 h 内（根据药物达峰时间调整）腹主动脉采血或眼球取血。

b）血液室温静置 30 min 后，3000 rpm 离心 15 min，分离血清。

c）血清于 56 ℃ 水浴灭活 30 min，以灭活补体。

d）0.22 μm 滤膜过滤除菌，分装后-80 ℃ 保存，避免反复冻融。

8.4.2.4　含药血清使用

a）含药血清在培养基中的添加比例一般为 5%~20%，根据预实验结果确定最佳浓度。

b）同一批次实验应使用同一批次制备的含药血清。

8.4.3　中药复方制剂制备

8.4.3.1　煎剂制备

a）按处方比例称取各药味，加水浸泡 30 min，武火煮沸后文火煎煮 30-60 min，过滤；药渣加水再煎 20-30 min，合并煎液，浓缩至所需浓度。

b）煎剂应经 0.22 μm 滤膜过滤除菌后使用，或经冷冻干燥后复溶使用。

8.4.3.2　成药制剂处理

a）片剂、胶囊等固体制剂应粉碎后用适当溶剂提取。

b）口服液等液体制剂可直接过滤除菌后使用。

8.4.4　其他中药吸收代谢途径制备

本操作属于可选受试物预处理，用于模拟中药口服后体内吸收、首过代谢过程。脑类器官芯片不具备吸收与代谢功能，需借助独立体外模型预先处理中药样品，转化后的样品再用于脑类器官芯片给药评价，其他类别受试物有需要时可参照执行。

a）肠吸收模拟：采用 Caco 2 单层细胞模型进行跨膜转运，收集接收液，脱蛋白、过滤，调整理化指标后作为供试样品，设置空白与原液对照。

b）肝代谢模拟：采用肝微粒体、肝细胞或肝类器官体系孵育中药样品，酶促反应终止后离心过滤，配制得到代谢后供试样品。

c）肠-肝串联模拟：依次串联肠吸收、肝代谢模型分步处理，分阶段收集样品。

d）质控要求：预处理后样品宜表征组分变化，pH、渗透压、溶剂含量不得损伤脑类器官。

9　药效评价方法

9.1　通则

9.1.1　实验设计

a）直接给药：将受试药物直接加入培养基中，适用于小分子、部分大分子受试物；

b）含药血清法：将含药血清按一定比例加入培养基中替代部分或全部血清，多用于中药等复杂受试物；

c）联合给药：对于需要同时给予造模剂和药物的情况，应注意给药顺序和时间间隔。

9.1.2　干预时长

药物干预时间应根据药效作用特点和预实验结果确定，一般为 24 h-14 天。

9.2　形态学评价

9.2.1　宏观形态观察

a）使用倒置相差显微镜观察并记录类器官直径、圆度、表面结构完整性及颜色变化。

b）使用 ImageJ 或同类图像分析软件测量类器官直径，计算圆度指数

（circularity=4pi×面积/周长²）。

c）观察指标：类器官是否保持类球形、表面是否光滑、有无明显凹陷或破裂、培养基是否浑浊。

9.2.2　组织学染色

a）HE 染色：类器官经 4%多聚甲醛固定、脱水、石蜡包埋、切片（厚度 5μM）后进行 HE 染色，观察整体组织结构、细胞密度、层状排列及坏死区域。

b）Nissl 染色：使用甲酚紫或硫堇染色显示神经元胞质中的 Nissl 体，评估神经元存活及分布。

c）定量指标：坏死核心面积占比、细胞密度（细胞数/mm²）、层状结构完整性评分（0~3 分）。

9.2.3　免疫组织化学/免疫荧光染色

a）冰冻切片或石蜡切片经抗原修复、封闭后，一抗 4℃ 孵育过夜，二抗室温孵育 1~2 h，DAPI 复染细胞核，封片后荧光显微镜或共聚焦显微镜观察。

b）神经元标志物：Tuj1（早期神经元）、MAP2（成熟神经元 dendrite）、NeuN（成熟神经元核）。

c）星形胶质细胞标志物：GFAP、S100beta。

d）少突胶质细胞标志物：O4（早期）、MBP（成熟髓鞘）。

e）神经前体细胞标志物：Sox2、Nestin、Pax6。

f）定量分析：使用 ImageJ 或 CellProfiler 软件计数阳性细胞数，计算阳性细胞比例（阳性细胞数/DAPI 阳性细胞总数×100%）。

9.3　细胞活力与毒性评价

9.3.1　CCK-8 法检测细胞代谢活性

a）类器官经药物处理后，加入含 10% CCK-8 溶液的培养基，37℃ 孵育 1-4 h。

b）使用酶标仪测定 450 nm 处吸光度（OD 值）。

c）细胞活力（%）=（实验组 OD 值 - 空白组 OD 值）/（对照组 OD 值 - 空白组 OD 值）×100%。

9.3.2　活/死细胞染色

a）类器官经 Calcein-AM（2 μM）和 PI（4 μM）双染，37℃ 孵育 30 min。

b）荧光显微镜观察：Calcein-AM 标记活细胞（绿色荧光），PI 标记死细胞（红色荧光）。

c）使用 ImageJ 定量分析绿色和红色荧光面积或强度，计算活/死细胞比例。

9.3.3　LDH 释放实验

a）收集培养上清液，使用 LDH 检测试剂盒测定 LDH 活性。

b）设置最大释放组（类器官经 1% Triton X-100 裂解）和自发释放组（无处理）。

c）细胞毒性（%）=（实验组 LDH-自发释放组 LDH）/（最大释放组 LDH-自发释放组 LDH）×100%。

9.3.4　细胞凋亡检测

a）TUNEL 染色：使用 TUNEL 试剂盒检测 DNA 断裂，荧光显微镜观察 TUNEL 阳性细胞（绿色）。

b）Caspase-3 活性检测：使用 Caspase-3 荧光底物（Ac-DEVD-AMC）或比色底物，测定 Caspase-3 酶活性。

c）流式细胞术：Annexin V-FITC/PI 双染检测早期和晚期凋亡细胞比例。

9.4　神经发育与分化评价

9.4.1　神经发生评价

a）神经前体细胞标志物检测：免疫荧光检测 Sox2、Nestin、Pax6 表达，评估神经干细胞/前体细胞增殖及维持能力。

b）BrdU/EdU 掺入实验：在药物处理期间加入 BrdU（10 μM）或 EdU（10 μM），检测细胞增殖能力。

c）神经球形成实验：将类器官消化成单细胞，低密度接种于低吸附培养板，观察神经球形成数量和大小。

9.4.2　神经元成熟与突触形成评价

a）突触前标志物：Synapsin I、Synaptophysin。

b）突触后标志物：PSD95、PSD93。

c）突触数量定量：使用 Synapsin I/PSD95 双标共定位分析，计算突触密度（突触点数/100 μM^2）。

d）神经递质标志物：GABA 能神经元（GAD67、GABA）、谷氨酸能神经元（VGLUT1、VGLUT2）、多巴胺能神经元（TH）。

9.4.3　皮层分层与区域特异性评价

a）皮层深层标志物：Ctip2（layer V）、Tbr1（layer VI）。

b）皮层浅层标志物：Satb2（layer II-IV）、Cux1（layer II-IV）。

c）区域特异性标志物：前额叶（FOXP2）、海马（PROX1）、中脑（TH、LMX1A）。

9.5　神经电生理功能评价

9.5.1　钙成像

a）钙指示剂加载：类器官经 Fluo-4 AM（5 μM）或 GCaMP6 病毒感染后，在含指示剂的培养基中孵育 30-60 min。

b）成像记录：使用共聚焦显微镜或宽场荧光显微镜，以 2~10 Hz 帧率记录至少 5~10 min。

c）分析指标：钙活动频率（events/min）、钙波传播速度、同步化指数（Synchronicity Index）、网络活动周期。

9.5.2　多电极阵列（MEA）记录

a）将类器官放置于 MEA 电极区域，加入少量 Matrigel 固定，加入培养基培养。

b）记录前于 37℃、5% CO2 条件下平衡 30 min。

c）记录参数：采样频率 20-25 kHz，记录时长 10-30 min。

d）分析指标：

放电频率（spike frequency，Hz）；

簇发放比例（burst ratio，%）；

网络簇发放频率（network burst frequency，次/min）；

同步化指数（synchronization index，0-1）；

功率谱分析（delta、theta、alpha、beta、gamma 波段）。

9.5.3　膜片钳记录

a）将类器官切片（200-300 μM 厚）或消化成单细胞后，进行全细胞记录。

b）记录模式：电流钳模式记录动作电位发放特性；电压钳模式记录突触后电流（EPSC/IPSC）。

c）分析指标：静息膜电位、动作电位阈值、动作电位幅度、半峰宽、放电频率-电流关系（F-I curve）、EPSC/IPSC 幅度及频率。

9.6　神经炎症与免疫评价

9.6.1　小胶质细胞活化评价

a）免疫荧光检测小胶质细胞标志物 Iba1、CD68、CD11b 表达。

b）形态学分析：活化小胶质细胞呈现阿米巴样形态（细胞体增大、突起缩短），静息态呈分支状。

c）定量指标：Iba1+细胞数量、CD68+细胞比例、活化/静息比例。

9.6.2　炎症因子检测

a）收集类器官培养上清液，使用 ELISA 或 Luminex 多因子检测平台测定炎症因子水平。

b）促炎因子：IL-1beta、IL-6、TNF-alpha、IL-18、MCP-1。

c）抗炎因子：IL-10、TGF-beta。

d）计算促炎/抗炎因子比值，评估炎症平衡状态。

9.6.3　炎症信号通路检测

a）Western blot 或免疫荧光检测 NF-kappaB 通路：IkappaBalpha 磷酸化、p65 核转位。

b）MAPK 通路：ERK1/2、JNK、p38 磷酸化水平。

c）NLRP3 炎症小体：NLRP3、ASC、Caspase-1 表达及裂解。

9.7　血脑屏障功能评价

9.7.1　血管化脑类器官模型构建

a）采用微流控芯片技术或 Transwell 共培养体系，将人脑微血管内皮细胞（hBMECs）、周细胞及星形胶质细胞与脑类器官共培养。

b）共培养时间一般为 7~14 天，期间定期更换培养基。

9.7.2　跨内皮电阻（TEER）测定

a）使用 TEER 测量仪测定共培养体系的电阻值。

b）TEER 值≥100 Omega·cm²提示血脑屏障完整性良好。

c）药物处理后 TEER 值下降提示屏障功能受损，TEER 值回升提示屏障修复。

9.7.3　通透性实验

a）荧光示踪分子：FITC-葡聚糖（4 kDa、40 kDa、70 kDa）或荧光素钠（Na-F）。

b）将荧光示踪分子加入血管腔侧，培养一定时间后检测脑侧荧光强度。

c）计算通透性系数（Pe）或表观渗透系数（Papp）。

9.7.4　紧密连接蛋白检测

a）免疫荧光检测紧密连接蛋白 ZO-1、Claudin-5、Occludin 的表达及定位。

b）Western blot 检测蛋白表达量变化。

9.8　线粒体功能评价

9.8.1　线粒体膜电位检测

a）使用 JC-1 或 TMRE 荧光探针检测线粒体膜电位。

b）健康线粒体 JC-1 聚集呈红色荧光，膜电位下降时 JC-1 单体呈绿色荧光。

c）定量指标：红/绿荧光强度比值。

9.8.2　ATP 含量测定

a）使用 ATP 生物发光检测试剂盒测定类器官 ATP 含量。

b）结果以 nmol/mg protein 或相对于对照组的百分比表示。

9.8.3　线粒体形态与分布

a）使用 MitoTracker Green 或 DeepRed 标记线粒体。

b）共聚焦显微镜观察线粒体形态（杆状、球状、碎片状）及在胞质中的分布。

c）使用 ImageJ 或 Fiji 软件进行线粒体形态学分析（长度、分支度、圆度）。

9.8.4　线粒体呼吸功能

a）使用 Seahorse XF 细胞能量代谢分析仪检测氧气消耗率（OCR）。

b）分析指标：基础呼吸、ATP 产生、最大呼吸、 spare respiratory capacity、质子漏。

9.9　氧化应激评价

9.9.1　活性氧（ROS）检测

a）使用 DCFH-DA（10 μM）或 CellROX 探针检测细胞内 ROS 水平。

b）流式细胞术或荧光显微镜定量分析。

c）结果以荧光强度相对于对照组的倍数表示。

9.9.2　抗氧化酶活性检测

a）超氧化物歧化酶（SOD）活性：WST-8 法或邻苯三酚自氧化法。

b）谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）活性：DTNB 法。

c）过氧化氢酶（CAT）活性：紫外分光光度法。

9.9.3　氧化损伤标志物检测

a）丙二醛（MDA）含量：TBA 法测定脂质过氧化产物。

b）4-羟基壬烯醛（4-HNE）：免疫组织化学或 ELISA 检测。

c）8-羟基脱氧鸟苷（8-OHdG）：DNA 氧化损伤标志物。

d）蛋白质羰基化：DNPH 法检测蛋白质氧化损伤。

9.9.4　抗氧化能力检测

a）总抗氧化能力（T-AOC）：FRAP 法或 ABTS 法。

b）还原型谷胱甘肽（GSH）/氧化型谷胱甘肽（GSSG）比值。

c）Nrf2/ARE 信号通路：Nrf2 核转位、HO-1、NQO1 表达检测。

10　评价指标体系与结果判定

10.1　评价指标体系

药物脑类器官芯片药效评价需设置多个检测指标。研究者可根据具体评价目的，选择全部或部分指标。

评价维度	核心指标	检测方法	判定标准	权重建议
形态结构	类器官直径、圆度、坏死面积比例	倒置显微镜、ImageJ 分析	CV<=20%，坏死面积<=10%	15%
细胞活力	活细胞比例、代谢活性	Calcein-AM/PI、CCK-8	活细胞>=80%，代谢活性变化<=15%	15%
神经元比例	NeuN+/DAPI、Tuj1+/DAPI	免疫荧光、流式	神经元比例>=30%	10%
神经发生	Sox2+、Nestin+、BrdU+细胞比例	免疫荧光	前体细胞比例正常范围	10%
突触功能	Synapsin I、PSD95 表达量及共定位	免疫荧光、WB	突触密度增加>=20%	10%
电生理	放电频率、burst 比例、同步化指数	MEA、钙成像	放电频率在正常生理范围或改善	15%
神经炎症	IL-1beta、IL-6、TNF-alpha 水平	ELISA、Luminex	促炎因子下降>=30%	10%
血脑屏障	TEER 值、通透性系数	微流控、TEER 仪	TEER>=100 Ohm·cm2	5%
线粒体功能	膜电位、ATP 含量、OCR	JC-1、Seahorse	膜电位恢复>=20%	5%
氧化应激	ROS 水平、MDA 含量、SOD 活性	DCFH-DA、TBA	ROS 下降>=25%，MDA 下降>=20%	5%

注：权重建议为参考值，具体权重可根据评价目的和疾病模型特点进行调整。判定标准中的百分比变化均为与模型对照组相比的相对变化。

10.2 结果判定原则

10.2.1 有效判定

受试药物在主要评价维度中至少 3 个维度（须包含细胞活力或功能活性维度）达到参考判定阈值，且呈剂量依赖性趋势，提示该受试物在本脑类器官芯片体外模型中显示药效潜力；该体外结果不能直接等同于体内治疗有效。

10.2.2 无效判定

受试药物在所有评价维度均未达到判定标准，或虽有个别指标改善但无统计学意义，提示在本体外模型未观察到明显药效作用，该结论不能直接等同于体内无效。

10.2.3 毒性判定

受试药物在最低测试浓度下导致类器官细胞活力下降超过 50%，或导致类器官结构严重破坏，提示在本体外模型条件下存在明显毒性风险，不能直接等同于体内毒性。

10.2.4　综合评价

应采用加权评分法或层次分析法（AHP）进行综合评分，结合专家评议形成最终评价结论。

11　质量控制

11.1　对照设置

a）空白对照：正常培养的脑类器官，不加任何处理因素。

b）溶剂对照：含等量溶剂（DMSO、PBS 等）的培养基处理组，DMSO 终浓度不超过 0.1%。

c）模型对照：疾病模型脑类器官，不给予药物处理。

d）阳性对照：根据疾病模型类型选择已知的阳性药物，如：

- 阿尔茨海默病模型：多奈哌齐（donepezil，1-10 μM）、美金刚（memantine，1-10 μM）；
- 帕金森病模型：左旋多巴（L-DOPA，10-100 μM）、雷沙吉兰（rasagiline，1-10 μM）；
- 脑缺血模型：依达拉奉（edaravone，10-100 μM）、尼莫地平（nimodipine，1-10 μM）；
- 神经炎症模型：地塞米松（dexamethasone，0.1~1 μM）、米诺环素（minocycline，10-50 μM）。

11.2　重复性要求

a）每个处理组至少设置 6 个独立类器官样本。

b）全部实验应独立重复至少 3 次。

c）批次间变异系数（CV）应控制在合理范围内，主要指标 CV 不超过 25%。

11.3　盲法要求

a）药效评价实验宜采用单盲或双盲设计。

b）图像采集和定量分析应由不知分组情况的技术人员完成。

11.4　批次记录

每批次实验应建立完整的实验记录，包括：

- 细胞系名称、来源、代次、批次号；
- 培养基及所有试剂的厂家、货号、批号、有效期；
- 仪器设备型号及校准状态；
- 操作人员及操作日期；
- 培养环境参数（温度、CO2 浓度、湿度）；
- 受试样品信息（名称、批号、配制方法、浓度）；
- 实验设计、原始数据及统计分析过程。

11.5　类器官质量监控

a）每批次类器官应进行质量鉴定，合格后方可用于药效评价。

b）实验过程中应定期监测类器官状态，发现大量死亡、污染等质量异常应及时终止实验，对不合格情况进行记录归档。

12　数据处理与统计分析

12.1　数据预处理

a）对原始数据进行完整性检查，核对数据记录与原始实验记录的一致性。

b）离群值检测：采用 Grubbs 检验、Dixon 检验或 3sigma 原则识别离群值。离群值应进行复核，确认为实验误差所致方可剔除，并记录剔除原因。

c）数据转换：必要时对数据进行对数转换或平方根转换以满足统计分析的正态性要求。

d）对于实验缺失值，应记录缺失产生原因，禁止随意填充；确需处理缺失值应采用适合本实验的统计策略并在报告中说明。

12.2　统计方法选择

a）正态性检验：采用 Shapiro-Wilk 检验或 Kolmogorov-Smirnov 检验判断数据是否符合正态分布。

b）方差齐性检验：采用 Levene 检验或 Bartlett 检验判断方差是否齐性。

c）两组比较：正态分布且方差齐性数据采用独立样本 t 检验；非正态分布或方差不齐数据采用 Mann-Whitney U 检验。

d）多组比较：正态分布且方差齐性数据采用单因素方差分析（One-way ANOVA）；

非正态分布数据采用 Kruskal-Wallis 检验。

12.3　多重比较校正

a）当进行多组比较时，应进行多重比较校正以控制 I 类错误。

b）常用校正方法：Bonferroni 校正（保守）、Tukey HSD（适用于方差分析事后比较）、Benjamini-Hochberg FDR 校正（适用于大规模比较）。

c）校正后的 P 值应明确标注。

12.4　效应量与置信区间

a）除报告 P 值外，应报告效应量（effect size），如 Cohen's d（两组比较）、eta-squared（方差分析）等。

b）应报告主要结果的 95%置信区间（95% CI）。

c）效应量解释标准：Cohen's d=0.2 为小效应，0.5 为中等效应，0.8 为大效应。

12.5　统计显著性水平

a）统一采用双侧检验，显著性水平 alpha=0.05。

b）P<0.05 认为差异具有统计学意义，P<0.01 认为差异具有高度统计学意义，P<0.001 认为差异具有极高度统计学意义。

12.6　量效关系分析

a）对受试药物不同剂量组的药效数据进行量效关系分析。

b）可采用非线性回归拟合量效曲线，计算半数有效浓度（EC50）或半数抑制浓度（IC50）。

c）评价量效关系是否符合 Hill 方程特征。

13　结果报告

13.1　报告内容

结果报告应包括以下基本信息：

- 实验目的与研究背景；
- 细胞来源及批次信息（细胞系名称、代次、核型、多能性验证结果）；
- 类器官培养方案（培养天数、培养基配方、基质材料、培养条件）；
- 类器官质量鉴定结果（形态学、细胞组成、功能鉴定）；

- 受试药物样品信息（名称、来源、批号、制备工艺、主要成分含量、配制浓度）；
- 实验设计（分组情况、样本量、重复次数、给药时间、药物干预窗口）；
- 检测方法及仪器设备；
- 原始数据及统计分析结果；
- 典型图像（形态学照片、免疫荧光图像、电生理记录等）；
- 结论与讨论。

13.2　图表要求

a）形态学照片应标明标尺、放大倍数及代表区域。

b）免疫荧光图像应标明通道、抗体稀释度及代表区域。

c）统计图表应包含误差线（标准差 SD 或标准误 SEM）、样本量标注、统计显著性标记（*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ns 无显著性差异）。

d）电生理记录应提供原始记录曲线及汇总统计图。

13.3　结论表述

a）药效结论应客观、准确，避免过度推断。

b）应明确受试药物的有效浓度范围、最佳作用时间及作用靶点推测。

c）应讨论受试药物药效的作用机制假说，并提出后续验证方案。

注：对于组分复杂的中药受试物，报告中宜说明组分特点对实验结果带来的潜在影响。

13.4　局限性说明

a）脑类器官芯片为体外简化模型，缺少完整人体血管网络、完整免疫系统、神经环路体内投射、代谢器官交互，体外实验结果不能直接外推人体体内药效、安全性；

b）本标准得到的数据仅作为药物研发阶段非临床参考资料，不可单独作为新药上市的决定性证据；

c）不同批次干细胞、类器官、芯片材料、受试物会显著影响实验结果，报告中应完整记录全部关键变量。

附录 A（资料性） 脑类器官培养关键参数

A.1 人多能干细胞质量要求

A.1.1 细胞活力：冻存复苏后活细胞率>=90%。

A.1.2 核型：46,XX 或 46,XY，无显著染色体异常（>=10 个中期分裂象分析）。

A.1.3 多能性标志物：Oct4、Sox2、Nanog 免疫荧光阳性率>=95%。

A.1.4 分化能力：体外三胚层分化（拟胚体形成）验证合格。

A.1.5 无菌检测：细菌（14 天培养阴性）、真菌（14 天培养阴性）、支原体（PCR 法阴性）。

A.2 培养基配方参考

A.2.1 EB 形成培养基：DMEM/F12 + 20% KnockOut Serum Replacement + 1x Non-essential Amino Acids + 1x GlutaMAX + 0.1 mM beta-mercaptoethanol + 10 μM Y-27632。

A.2.2 神经诱导培养基：DMEM/F12 + N2 supplement + B27 supplement + 10 μM SB431542 + 2 μM Dorsomorphin + 3 μM CHIR99021。

A.2.3 神经分化培养基：Neurobasal medium + B27 + N2 + 20 ng/mL BDNF + 20 ng/mL GDNF + 20 ng/mL NT-3 + 0.5 mM cAMP + 200 μM L-ascorbic acid。

A.2.4 长期维持培养基：BrainPhys neuronal medium + N2-A + B27 + 1x vitamin A + 10 ng/mL BDNF + 10 ng/mL GDNF + 1.5 ug/mL laminin。

A.3 培养条件参数

A.3.1 温度：37.0+-0.5℃。

A.3.2 CO2 浓度：5.0+-0.2%。

A.3.3 湿度：饱和湿度（>=95%）。

A.3.4 轨道摇床转速：60-90 rpm（根据培养瓶体积调整）。

A.3.5 培养基更换：每 2~3 天更换 50%~80%体积新鲜培养基。

A.4 类器官直径与成熟度对应参考

A.4.1 D14：直径 200-400 μM，神经上皮玫瑰花环结构明显。

A.4.2 D30：直径 300-600 μM，出现早期神经元（Tuj1+），少量星形胶质细胞。

A.4.3 D60：直径 400-800 μM，神经元比例>=30%，星形胶质细胞比例 10%-30%，出现自发电活动。

A.4.4 D90：直径 500-1000 μM，神经元成熟（NeuN+、MAP2+），突触形成明显，

电生理活动增强。

A.4.5 D120+：直径 600-1200 μM，多种神经元亚型共存，网络振荡出现，但中心坏死风险增加。

附录 B（资料性） 中枢药物药效评价典型疾病模型

B.1 阿尔茨海默病（AD）模型

B.1.1 Aβ42 寡聚体诱导模型：合成 Aβ42 寡聚体（0.5~5 μM）处理类器官 3~7 天，诱导神经毒性、Tau 过度磷酸化及炎症反应。

B.1.2 基因突变模型：APP Swedish 突变、PSEN1 DeltaE9 突变或 Tau P301L 突变 iPSC 来源类器官，自发形成 Aβ沉积及神经纤维缠结样病理。

B.1.3 评价指标：Aβ40/42 水平、Tau 磷酸化（p-Tau Ser396/404）、突触丢失、神经元凋亡。

B.2 帕金森病（PD）模型

B.2.1 神经毒素诱导模型：MPP+（10-100 μM）或 6-OHDA（50-200 μM）处理类器官，诱导多巴胺能神经元选择性损伤。

B.2.2 基因突变模型：LRRK2 G2019S、SNCA A53T 或 PARK2 突变 iPSC 来源类器官。

B.2.3 评价指标：TH+多巴胺能神经元比例、alpha-synuclein 聚集、线粒体功能障碍、氧化应激。

B.3 脑缺血模型

B.3.1 氧糖剥夺（OGD）模型：类器官在无糖培养基、低氧环境（1%-2% O2）中培养 30 min-4 h，模拟脑缺血损伤。

B.3.2 兴奋性氨基酸毒性模型：谷氨酸（100 μM-1 mM）或 NMDA（50-200 μM）处理类器官。

B.3.3 评价指标：神经元死亡、Ca2+超载、ROS 产生、线粒体膜电位下降。

B.4 神经炎症模型

B.4.1 LPS 诱导模型：LPS（100 ng/mL-10 ug/mL）处理类器官，激活小胶质细胞及星形胶质细胞。

B.4.2 Aβ诱导炎症模型：Aβ42 寡聚体处理同时诱导神经毒性及炎症反应。

B.4.3 评价指标：小胶质细胞活化、炎症因子释放、星形胶质细胞增生。

B.5 神经发育障碍模型

B.5.1 自闭症谱系障碍：SHANK3、MECP2、CHD8 等基因突变 iPSC 来源类器官。

B.5.2 唐氏综合征：21 三体 iPSC 来源类器官。

B.5.3 评价指标：神经元分化异常、突触形成减少、神经网络活动异常。

B.6 神经精神疾病模型

B.6.1 抑郁症模型：慢性应激激素（皮质酮，1-10 μM）处理类器官。

B.6.2 精神分裂症：DISC1、NRG1 等风险基因突变 iPSC 来源类器官。

B.6.3 评价指标：神经元成熟延迟、突触功能异常、神经炎症。

附录 C（资料性） 主要仪器设备与试剂

C.1 主要仪器设备

C.1.1 生物安全柜（II 级 A2 型），HEPA 过滤效率>=99.99%。

C.1.2 CO2 细胞培养箱，温度控制精度+-0.1℃，CO2 控制精度+-0.1%。

C.1.3 倒置相差显微镜（带成像系统），物镜倍数 4x~40x。

C.1.4 激光共聚焦显微镜，配备 405 nm、488 nm、561 nm、633 nm 激光器。

C.1.5 冰冻切片机，切片厚度范围 1-100 μM。

C.1.6 石蜡切片机，切片厚度范围 1-60 μM。

C.1.7 流式细胞仪，至少配备 3 色激光器。

C.1.8 多电极阵列记录系统（MEA），电极数>=60 通道。

C.1.9 膜片钳记录系统，包含放大器、数模转换器及分析软件。

C.1.10 实时荧光定量 PCR 仪，支持至少 3 个荧光通道。

C.1.11 多功能酶标仪，支持吸光度、荧光及化学发光检测。

C.1.12 Western blot 系统，包含电泳、转印及成像设备。

C.1.13 微流控芯片系统，支持 TEER 实时监测。

C.1.14 Seahorse XF 细胞能量代谢分析仪。

C.1.15 轨道摇床，转速范围 20-200 rpm。

C.2 主要试剂

C.2.1 人多能干细胞培养基及补充剂（mTeSR1、E8 等）。

C.2.2 神经诱导及分化培养基组分（DMEM/F12、Neurobasal、N2、B27 等）。

C.2.3 生长因子（BDNF、GDNF、NT-3、EGF、bFGF 等）。

C.2.4 小分子化合物（Y-27632、SB431542、Dorsomorphin、CHIR99021 等）。

C.2.5 Matrigel 或 Geltrex（低生长因子型）。

C.2.6 一抗及荧光二抗（神经元、胶质细胞、突触标志物等）。

C.2.7 CCK-8 细胞活力检测试剂盒。

C.2.8 LDH 细胞毒性检测试剂盒。

C.2.9 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒。

C.2.10 炎症因子 ELISA 试剂盒（IL-1beta、IL-6、TNF-alpha、IL-10 等）。

C.2.11 ROS 检测试剂（DCFH-DA）。

C.2.12 线粒体膜电位检测试剂（JC-1、TMRE）。

C.2.13 ATP 生物发光检测试剂盒。

附录 D（资料性） 评价指标检测方法详则

D.1 免疫荧光染色操作规程

D.1.1 样本准备：类器官经 4%多聚甲醛固定 4-24 h，蔗糖梯度脱水（10%、20%、30%各过夜），OCT 包埋，冰冻切片（厚度 10-20 μM）。

D.1.2 抗原修复：必要时使用柠檬酸钠缓冲液（pH 6.0）微波修复或胰蛋白酶消化修复。

D.1.3 封闭：5%-10%正常血清（与二抗同种属）室温封闭 30-60 min。

D.1.4 一抗孵育：稀释于含 0.3% Triton X-100 的 PBS 中，4℃ 过夜（12-16 h）。

D.1.5 洗涤：PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。

D.1.6 二抗孵育：荧光标记二抗（1:500-1:1000 稀释），室温避光孵育 1-2 h。

D.1.7 核染色：DAPI（1 ug/mL）室温孵育 5-10 min。

D.1.8 封片：抗荧光淬灭封片剂封片，指甲油封边。

D.1.9 成像：共聚焦显微镜采集图像，设置对照（无一抗、无二次抗）。

D.2 Western blot 操作规程

D.2.1 蛋白提取：RIPA 裂解液（含 PMSF 及蛋白酶/磷酸酶抑制剂）冰上裂解 30 min，12000 rpm、4℃ 离心 15 min，取上清。

D.2.2 蛋白定量：BCA 法测定蛋白浓度。

D.2.3 电泳：每孔上样 20-50 ug 蛋白，SDS-PAGE 电泳（浓缩胶 80 V，分离胶 120 V）。

D.2.4 转膜：湿转或半干转，PVDF 膜，恒流 300 mA 90 min。

D.2.5 封闭：5%脱脂奶粉或 BSA 室温封闭 1-2 h。

D.2.6 一抗孵育：4℃ 过夜。

D.2.7 二抗孵育：HRP 标记二抗室温 1 h。

D.2.8 显影：ECL 化学发光法，凝胶成像系统采集图像。

D.2.9 定量：ImageJ 软件分析条带灰度值，以 GAPDH 或 beta-actin 为内参。

D.3 qPCR 操作规程

D.3.1 RNA 提取：TRIzol 法或柱式 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。

D.3.2 RNA 质量检测：NanoDrop 测定浓度及 A260/A280 比值（1.8-2.1）。

D.3.3 cDNA 合成：反转录试剂盒合成 cDNA，RNA 用量 500 ng-2 ug。

D.3.4 qPCR 反应：SYBR Green 或 TaqMan 探针法，95℃ 预变性 30 s，40 个循环

（95℃ 5 s，60℃ 30 s）。

D.3.5 数据分析：2^-DeltaDeltaCt 法计算相对表达量，以 GAPDH 或 beta-actin 为内参。

D.4 ELISA 操作规程

D.4.1 标准品配制：按试剂盒说明书梯度稀释标准品。

D.4.2 样本处理：培养上清液直接检测或适当稀释。

D.4.3 加样：每孔加样 100 uL，设标准孔、空白孔及样本孔。

D.4.4 孵育：37℃ 孵育 60-120 min。

D.4.5 洗涤：洗涤液洗涤 3 次，每次浸泡 30 s。

D.4.6 显色：加入 TMB 显色液，37℃ 避光孵育 15-20 min。

D.4.7 终止：加入终止液，轻轻混匀。

D.4.8 读数：酶标仪测定 450 nm 处吸光度（参考波长 570 nm 或 630 nm）。

D.4.9 定量：绘制标准曲线，计算样本浓度。

参 考 文 献

[1] GB/T 1.1-2020. 标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则[S]. 北京：中国标准出版社，2020.

[2] Lancaster M A, Renner M, Martin C A, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly[J]. Nature, 2013, 501(7467): 373-379.

[3] Qian X, Nguyen H N, Song M M, et al. Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure[J]. Cell, 2016, 165(5): 1238-1254.

[4] Jo J, Xiao Y, Sun A X, et al. Midbrain-like organoids from human pluripotent stem cells contain functional dopaminergic and neuromelanin-producing neurons[J]. Cell Stem Cell, 2016, 19(2): 248-257.

[5] Raja W K, Mungenast A E, Lin Y T, et al. Self-organizing 3D human neural tissue derived from induced pluripotent stem cells recapitulate Alzheimer's disease phenotypes[J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0161969.

[6] Kim H, Park H J, Choi H, et al. Modeling G2019S-LRRK2 sporadic Parkinson's disease in 3D midbrain organoids[J]. Stem Cell Reports, 2019, 12(1): 54-67.

[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典（2025 年版一部）[M]. 北京：中国医药科技出版社，2025.

[8] 国家药品监督管理局. 药物非临床研究质量管理规范[S]. 2017.

[9] ICH M3(R2). Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals[S]. 2009.

[10] ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity[S]. 2009.

[11] T/CSCB 0001-2020. 干细胞通用要求[S]. 2020.

[12] Sloan S A, Andersen J, Pasca A M, et al. Generation and assembly of human brain region-specific three-dimensional cultures[J]. Nature Protocols, 2018, 13(9): 2062-2085.

[13] Camp J G, Badsha F, Florio M, et al. Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development[J]. PNAS, 2015, 112(51): 15672-15677.

[14] Quadrato G, Nguyen T, Macosko E Z, et al. Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids[J]. Nature, 2017, 545(7652): 48-53.

[15] Velasco S, Kedaigle A J, Simmons S K, et al. Individual brain organoids reproducibly form cell diversity of the human cerebral cortex[J]. Nature, 2019, 570(7762): 523-527.

[16] 刘建勋，任振华. 中药药效学研究方法学[M]. 北京：人民卫生出版社，2018.

[17] 张伯礼，吴勉华. 中医内科学[M]. 北京：中国中医药出版社，2017.