

NovoCyte 流式细胞仪与 RTCA 实时细胞分析技术在中药方面的应用

中医药学是中国民族文化中的瑰宝,近些年来,在国家的重视和支持下,中医药界、中西医结合界以及相关学科领域的众多学者采用现代、多学科的技术和方法对中医药进行较为深入的研究,并取得了较为丰硕的成果,从各种角度印证了中医药学的科学性,展现出中医药理论现代科学的实质,提高了中医药防治疾病的临床疗效。新冠肺炎疫情发生以来,中医药防治也发挥了巨大作用。

一、流式细胞术在中药方面的应用

流式细胞术是一项细胞水平的精密检测技术,从同一个单细胞中可以同时测得多种参数,对中医药的作用机制和机理研究、以及从细胞和分子生物学水平认识中医药提供了可靠的手段。

Agilent NovoCyte 系列流式细胞仪是流式领域中的创新突破,从单激光到 5 激光 30 通道,涵盖了低、中、高不同配置的需求,拥有出色的灵敏度、稳定性、分辨率、速度和灵活性,可达 7.2 个数量级宽的动态检测范围,可轻松识别 100 纳米范围内的颗粒。其具有一键开关机、样本间自动清洗等自动维护功能,核心硬件采用业内顶尖的品牌,保证仪器性能与结果的稳定性,并可搭配自动上样系统,兼容不同孔管类型,可集成到不同的实验室自动化平台中,能够实现无人值守自动化采集功能。搭配高度简洁直观的 NovoExpress 软件使用,系统可实现全自动运行,操作简单,能够在数据采集、分析和报告方面提供卓越的用户体验。NovoExpress 软件具有合规的审计追踪功能,在帮助科研用户的同时,也能更好的服务于企业用户。



(一) 研究肿瘤药物对细胞的作用机理

1. 单方药物诱导细胞凋亡和线粒体膜电位降低:

采用不同浓度(0、25、50、100 $\mu\text{g/ml}$)的青蒿琥酯干预 MDA-MB-231 细胞 24 h, 利用流式细胞术检测细胞凋亡情况及线粒体膜电位。结果显示, 与对照组比较, 25、50 及 100 $\mu\text{g/ml}$ 青蒿琥酯作用于 MDA-MB-231 细胞 24 h, 细胞凋亡率显著增高($P < 0.01$, 图 2), 线粒体膜电位显著降低($P < 0.01$, 图 3), 且呈浓度依赖性。

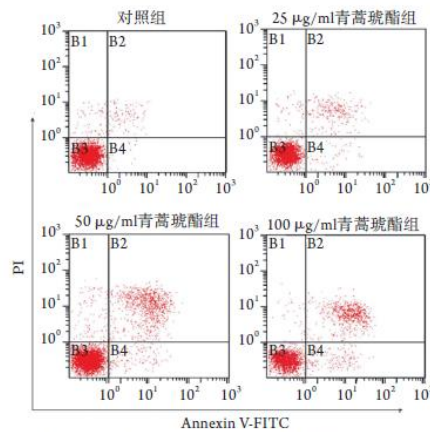


图2 青蒿琥酯诱导MDA-MB-231细胞凋亡(流式细胞术, $n=3$)

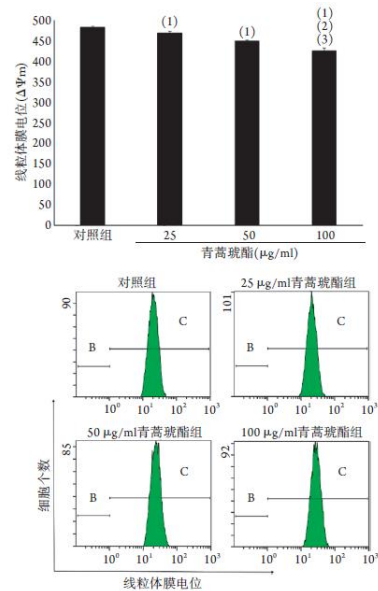


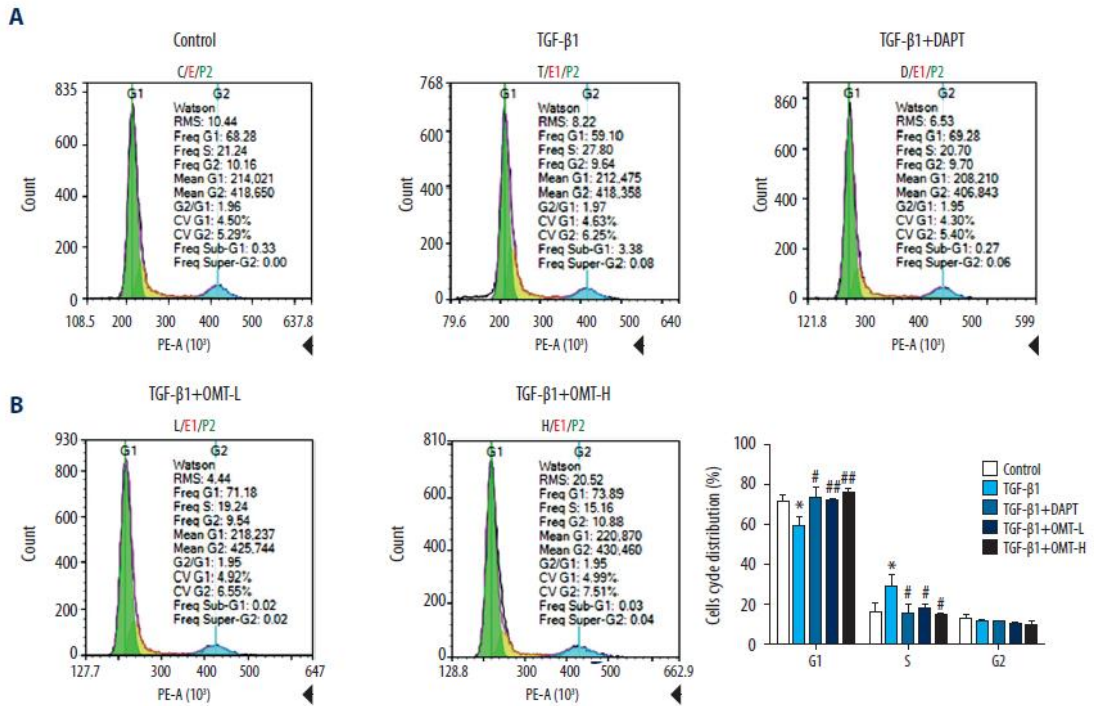
图3 青蒿琥酯调控MDA-MB-231细胞线粒体膜电位(流式细胞术, $n=3$)

2. 复方药物抑制肿瘤细胞周期

复方苦参注射液作用 48 h 后, 大肠癌 LoVo 细胞可检测亚 G1 峰, 凋亡率为(7.3 ± 1.5)%, 与对照组(2.1 ± 0.5)%相比有明显升高。经细胞周期分析发现 S 期细胞比例明显增高, 呈现出 S 期阻滞现象。

3. 中药成分的机理研究

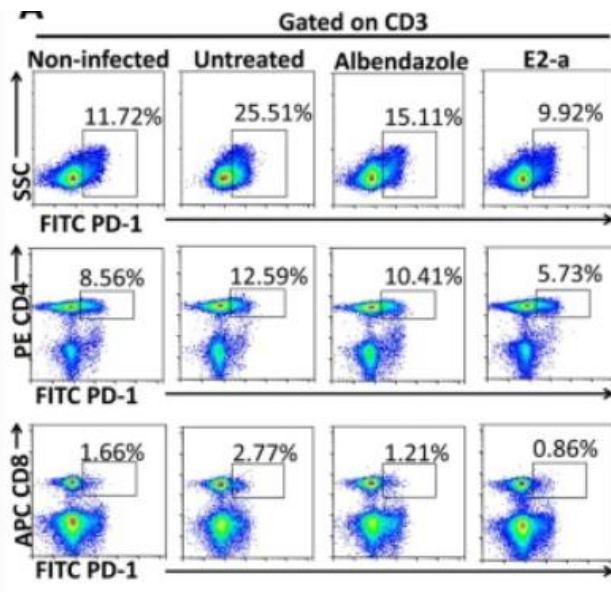
氧化苦参碱 (OMT) 是中药苦参的提取物, 具有各种药理作用, 特别是对心血管系统。通过流式细胞术发现 OMT 通过 G1 期阻滞抑制 TGF- β 1 诱导的心肌纤维化。



使用 NovoExpress 软件一键拟合的细胞周期分析数据

4. 中药成分的免疫调节作用

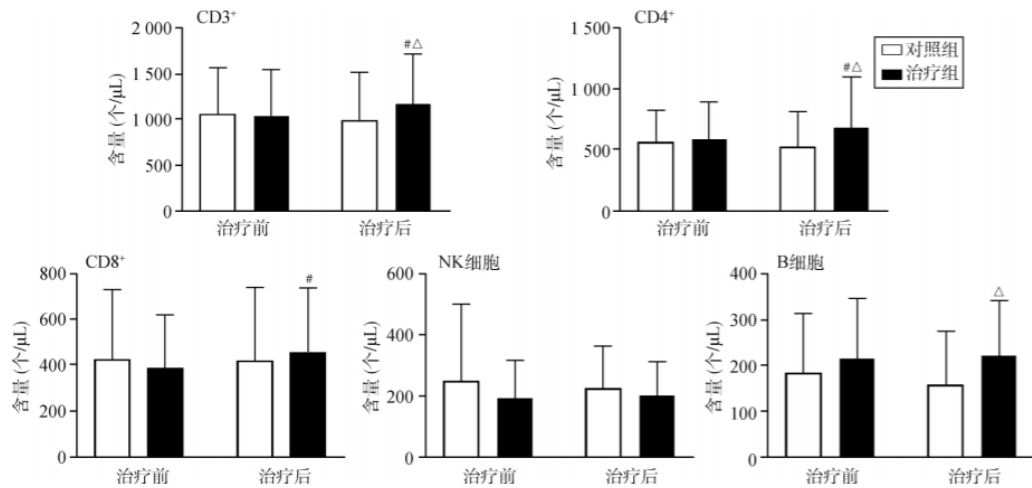
主要成分为苦参碱和槐果碱的水溶性生物碱 E2-a，可以上调 CD3 + CD4 + T 细胞亚群的频率，使 CD3 + PD-1 + T 细胞亚群的频率降低。通过减少 PD-1 的表达并加速抗原特异性 T 细胞的细胞因子分泌，可以抑制寄生虫病感染的囊肿发展并增强特异性免疫反应。



使用流式细胞术计数 CD3+, CD4+及 CD8+各个亚群的 PD-1+T 细胞

5. 针灸对淋巴细胞亚群比例及绝对计数的影响

对中晚期非小细胞肺癌因性疲乏患者用常规中西药结合治疗（对照组）基础上联合调益三焦针灸法（温和灸膻中、中脘、气海、足三里，针刺血海、外关、太冲）治疗。治疗后，与对照组比较，B 细胞、CD4+ T 细胞的百分比和绝对计数上升（ $P < 0.05$ ），CD3+ T 细胞计数明显升高（ $P < 0.05$ ），推测其作用机制可能是通过调节淋巴细胞数量、改善免疫功能实现的。



注：与本组治疗前比较， $^{\#}P < 0.05$ ；与同期对照组比较， $^{\Delta}P < 0.05$

图 4 两组中晚期非小细胞肺癌因性疲乏患者治疗前后淋巴细胞亚群绝对计数比较（ $\bar{x} \pm s$ ）

（二）药效及疗效评价：

1. 评价活血化瘀药物对血小板功能的影响

以 CD61 标记所有血小板，CD62p 标记活化血小板，采用流式细胞术检测血小板活化，只需取少量外周血，经单克隆抗体标记后即可快速、稳定地检测。随着流式细胞仪检测手段的完善，其检测的敏感性和特异性也大大提高。因此，完全可以通过建立一种相对简单的流式细胞仪检测外周血中 CD62p 含量或百分率的模型，达到检测抗血小板活化类活血化瘀药物生物活性的目的。

2. 对促血小板形成中药进行活性筛选和评价

通过体外培养骨髓细胞，利用不同细胞因子组合诱导向巨核细胞分化，比较各种诱导方法对向巨核细胞分化的影响，选择 7-AAD- Lin- CD117- CD41+ 巨核细胞的检测用于中药及从中药提取分离化合物的促血小板作用筛选、活性评价和作用机制研究。

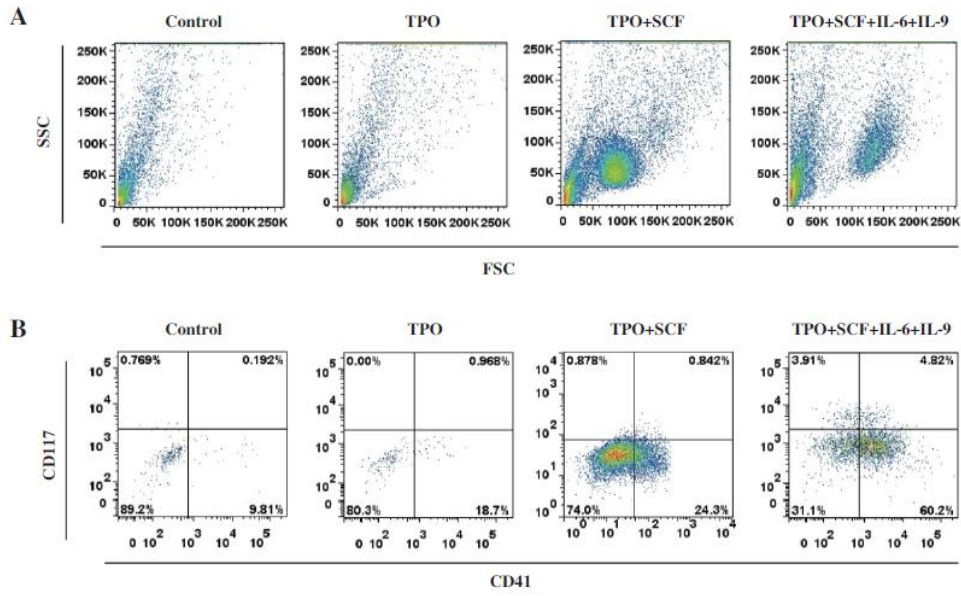


Figure 2. Analysis of differentiation of bone marrow cells into megakaryocytes by flow cytometry. After bone marrow cells were induced with different conditions for 6 d, the cells were collected, stained with 7-AAD and fluorescent labelled antibodies, and determined with flow cytometry.

流式细胞术分析骨髓细胞向巨核细胞的分化

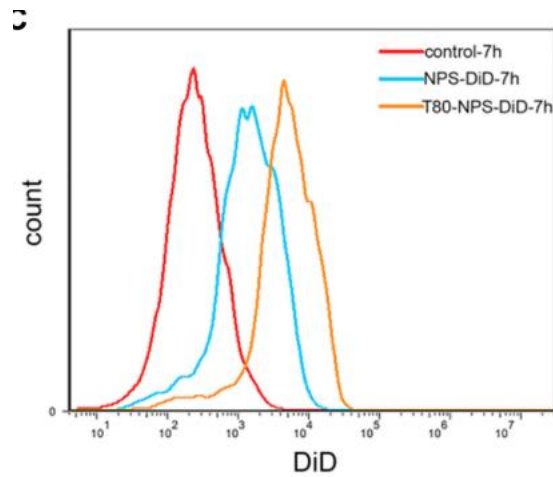
3. 中药成分的纳米药物在体内的摄取

钩藤碱 (Rhynchophylline, RIN) 是常用中药钩藤的主要活性成分，常被用于中枢神经系统疾病包括中风、阿尔茨海默病等的治疗。由于其在脑组织中的低溶解度以及难以穿过血脑屏障，应用受到局限。

用流式细胞仪检测 bEnd.3 细胞对于纳米颗粒的摄取发现，将钩藤碱制成纳米颗粒后可增加脑细胞对药物的摄取效率。



钩藤碱纳米药物结构示意图



流式细胞术分析 bEnd.3 细胞对于纳米颗粒的摄取效率

流式细胞术的检测目标广泛，从细胞到核酸以及各类分子，还可以应用于中药对细胞因子、激素受体表达的影响，对细胞粘附分子表达的影响，对免疫相关细胞亚群的影响，对细胞内酶的表达影响等多个方面，相信随着中医药学的不断发展，流式细胞术可以给予研究人员更多的支持。

二、RTCA 实时细胞分析技术在中药方面的应用

Agilent xCELLigence RTCA 实时细胞分析技术采用特殊工艺，在细胞培养板的每个细胞生长孔底部整合了金微电极传感器阵列，用以构建实时、动态、定量跟踪细胞形态和增殖分化改变的细胞阻抗检测传感器系统，该方法无需对细胞进行染料标记，操作简便快速，无过多人为干涉，具有更高的检测灵敏度与重复性的特点，可客观精确的呈现检测结果，广泛应用于新药研发、免疫治疗、疫苗研发、毒理学、安全药理学、质控和基础生命科学研究。xCELLigence RTCA eSight 将显微成像与实时无标记检测进行整合，实现了活细胞成像与高灵敏度生物传感技术的完美结合，阻抗生物传感器与明视场和 3 个荧光通道相结合，可以满足客户同时对同一细胞群进行实时阻抗和成像检测。另外，xCELLigence RTCA Cardio/CardioECR/ePacer 专注于心肌细胞研究，可以检测心肌细胞的跳动与场电位，并可促进心肌细胞的成熟，广泛用于药物开放中的心脏安全评价。



xCELLigence RTCA SP



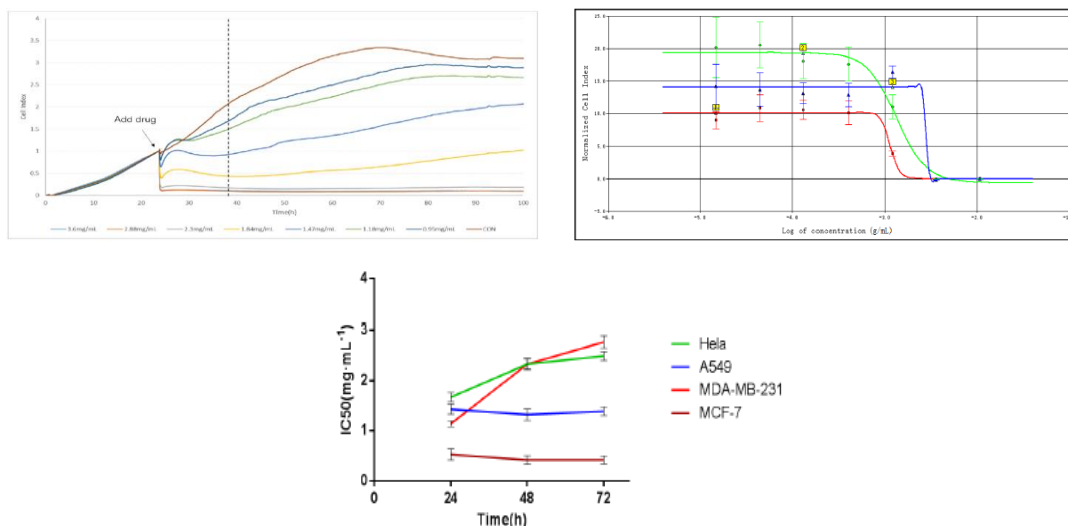
xCELLigence RTCA eSight



xCELLigence RTCA CardioECR

1. 中药质量评价研究

由于中药的有效成分复杂，因此很难进行质量评估；其中一些是特定的，而某些是未定义的。中药中几种成分的确不能代表整个制剂，也不能反映出制剂的整体效果。因此，我们希望通过细胞效应检测进行初步研究，以对中药进行质量评估。RTCA 为药物开发中的各种研究应用程序提供了动态，实时，无标记的细胞分析。通过 RTCA 可以定量检测中药的整体效果。以复方丹参制剂为代表制剂，建立了中药质量评价的新方法，确定了复方丹参制剂的细胞指数 (CI) 和 IC50，并获取了时间/剂量依赖性细胞反应谱 (TCRP)。CI 和 TCRPs 的趋势反映了药物对细胞的作用（促进或抑制），并且通过药代动力学实验证实了结果与药物的生物活性相关性。RTCA 系统可用于评价复方丹参制剂的效力，为定量表征中药的生物活性提供了新思路和新方法。

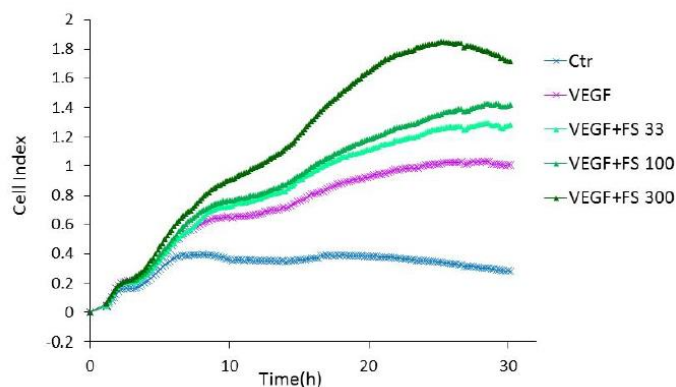


不同浓度复方丹参滴丸作用于细胞的时间/剂量依赖性细胞反应谱

2. 中药活性成分作用评价

中药材含有多种生物活性成分，具有发现新药或配方的巨大潜力。以三七为例，主要活性成分为皂苷，其中三七花 FS 中皂苷含量较高，是一种流行的传统药物。对三七花中活

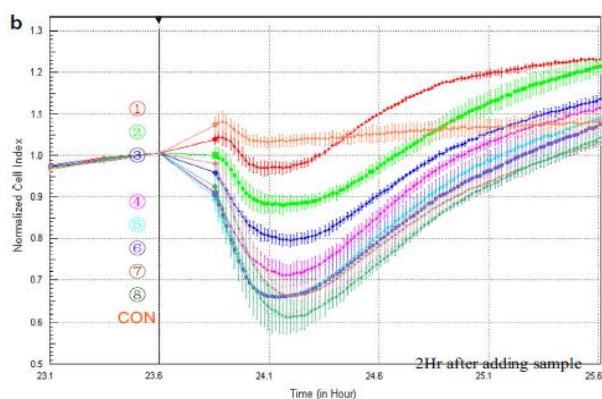
性成分皂苷进行研究，发现其可能激活 vegfa mRNA 转录，增加 VEGF 诱导的 HUVECs 细胞迁移，发挥促血管生成作用，提示三七花皂苷的纯化制剂可能具有预防和治疗心血管疾病的潜力。



三七花 FS 促进 VEGF 诱导的 HUVECs 细胞迁移

3. 中药缓释颗粒释放溶出动力学评价

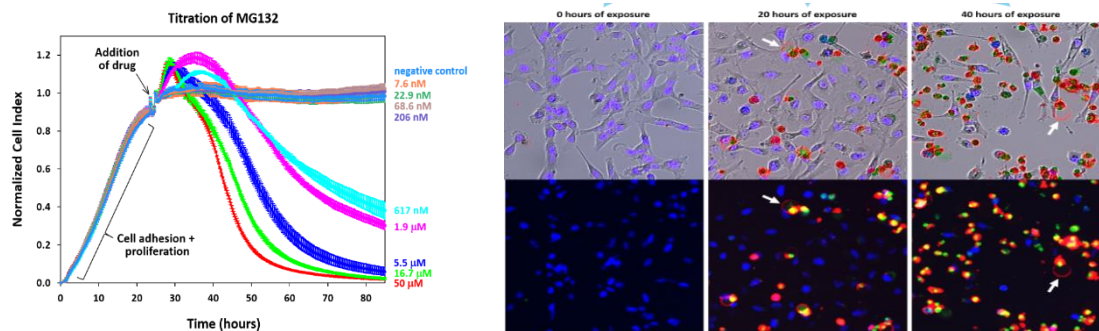
微丸具有流动性好，释药稳定、均匀等特点，微丸剂型已经广泛用于西药缓控释制剂中。可以提高药物制剂的稳定性、安全性，减少服药次数，提高药物生物利用度，增加临床适用的新剂型等特点。复方沙门冬凌草治疗肝炎缓释微丸由沙门冬凌草、柴胡、甘草等组成。RTCA 可以反映中药制剂中化学成分聚集的浓度，包括已知的和未知的。因此，RTCA 也能反映中药缓释制剂的整体药物效应和动态释放规律。这个案例中，LX2 细胞处理样本在不同时间点，然后通过使用 xCELLigence RTCA 持续的累积释放配方在不同时间点计算，因此缓释制剂的体外释放特征进行评估。建立了体外动力学模型，与常规体外释放试验相比，该模型更接近体内环境，与体内药代动力学试验相比更方便。该方法为中药缓释制剂的药代动力学研究提供了新的思路和方法。



缓释微丸药物不同释放时间的细胞曲线

4. xCELLigence RTCA eSight 成像与阻抗的结合

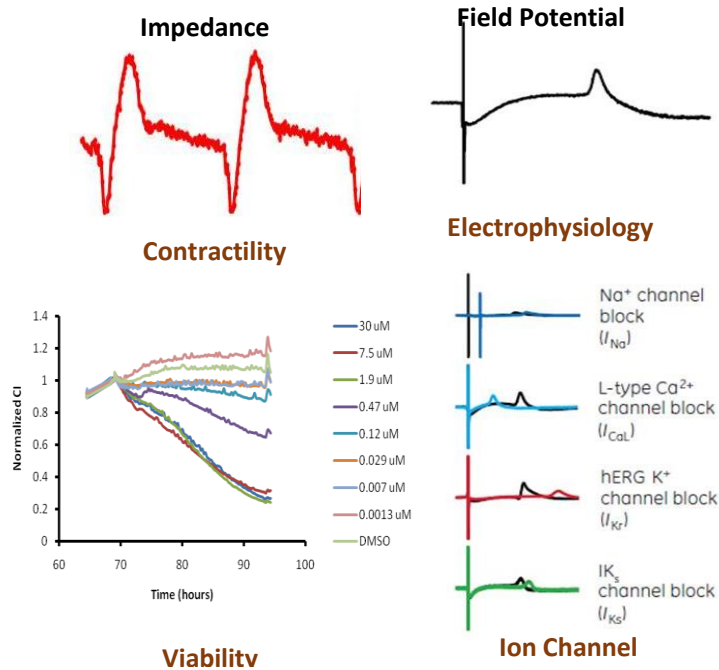
xCELLigence RTCA eSight 将实时阻抗监测的简便性、分析灵敏度和客观性与活细胞成像的高特异性读数相结合，能够连续追踪细胞生长过程，可获得细胞行为前所未有的细节。



xCELLigence RTCA eSight 应用举例

5. 中药心脏安全评价

Agilent xCELLigence Cardio 系统是在微电子生物传感技术的基础上进行的扩展和升级，可以检测心肌细胞的物理特性，诸如搏动频率、幅度，从而评估心脏毒性和细胞健康活力。xCELLigence RTCA CardioECR 系统可同时实现离子通道活性与心肌舒缩力无损伤评估。该系统可对心肌细胞兴奋-收缩偶联过程进行综合性评价。专用软件用于鉴定和评估影响离子通道活性、心肌细胞舒缩力及细胞活力的不利因素，从而为心脏风险评估提供一个具有高度预测性的分析平台。xCELLigence RTCA ePacer 是专门用于电刺激促进心肌细胞成熟的实验平台，为获得功能成熟的 hiPSC 心肌细胞提供了一种简便有效的方法，从而可以使用更为成熟的心肌细胞来评价药物的心脏毒性。



xCELLigence RTCA CardioECR 检测心肌细胞跳动与场电位应用举例

【参考文献】

1. 杨超, 张彦收, 刘亮等, 青蒿琥酯对乳腺癌细胞的生长抑制作用及其机制, 解放军医学杂志 2020年8月28日 第45卷 第8期, 804-809.
2. 徐月, 秦剑, 周远大等.复方苦参方剂对大肠癌 LoVo 细胞体外增殖凋亡的影响, 第四军医大学学报, 2009, 30 (15) :1391 -1393.
3. Linglu Zhao, Peng Luo et.al Oxymatrine Inhibits Transforming Growth Factor b1 (TGF-b1)-Induced Cardiac Fibroblastto-Myofibroblast Transformation (FMT) by Mediating the Notch Signaling Pathway In Vitro, *Med Sci Monit.* 2018; 24: 6280–6288.
4. Luo, Y., Zhang, G., Liu, X. et al. Therapeutic and immunoregulatory effects of water-soluble alkaloids E2-a from Sophora moorcroftiana seeds as a novel potential agent against echinococcosis in experimentally protoscolex-infected mice. *Vet Res* 49, 100 (2018).
5. 华晓东, 侯娟, 徐琳, 税凤春等, 不同方法检测丹参多酚酸对血小板功能影响的比较, 2019, 31 (5), 11-13.
6. 李芸芊, 郭冉, 朱枝祥等, 体外诱导骨髓细胞分化成巨核细胞的方法学研究, 中国实验血液学杂志, 2020; 28 (4): 1357-1362.

7. Ruiling Xu, Chunmei Fu et.al, Rhynchophylline Loaded-mPEG-PLGA Nanoparticles Coated with Tween-80 for Preliminary Study in Alzheimer's Disease ,*Int J Nanomedicine*. 2020; 15: 1149–1160.
8. 李文涛, 刘云鹤, 于建春等, 调益三焦针灸法对中晚期非小细胞肺癌癌因性疲乏的疗效及免疫功能的影响, 针刺研究, 2020 年 12 月, 第 45 卷, 第 12 期, 1000-1005.
9. 马晓斐, 严国俊, 潘金火等, 基于实时细胞电子分析技术的复方丹参片质量评价研究, 国际中医中药杂志, 2020 年 3 月, 第 42 卷, 第 3 期, 251-255.
10. Guojun Yan, Zhitao Zhu, Liliang Jin, et al, Study on the Quality Evaluation of Compound Danshen Preparations Based on the xCELLigence Real-Time Cell-Based Assay and Pharmacodynamic Authentication, *Molecules* 2018, 23, 2090.
11. Binrui Yang, Kwokkuen Cheung, Xin Zhou, et al, Amelioration of acute myocardial infarction by saponins from flower buds of *Panax notoginseng* via pro-angiogenesis and anti-apoptosis, *Journal of Ethnopharmacology*, 2016, 181 (1): 50-58.
12. 马晓斐, 王建春, 潘金火等, 基于细胞生物电传感效应的复方丹参片溶出动力学研究, 中草药, 2019, 第 17 期.
13. Guojun Yan, Wei Sun, Yanfang Pei, et al, A novel release kinetics evaluation of Chinese compound medicine: Application of the xCELLigence RTCA system to determine the release characteristics of *Sedum sarmentosum* compound sustained-release pellets, *Saudi Pharm J*, 2018 Mar; 26 (3): 445-451.