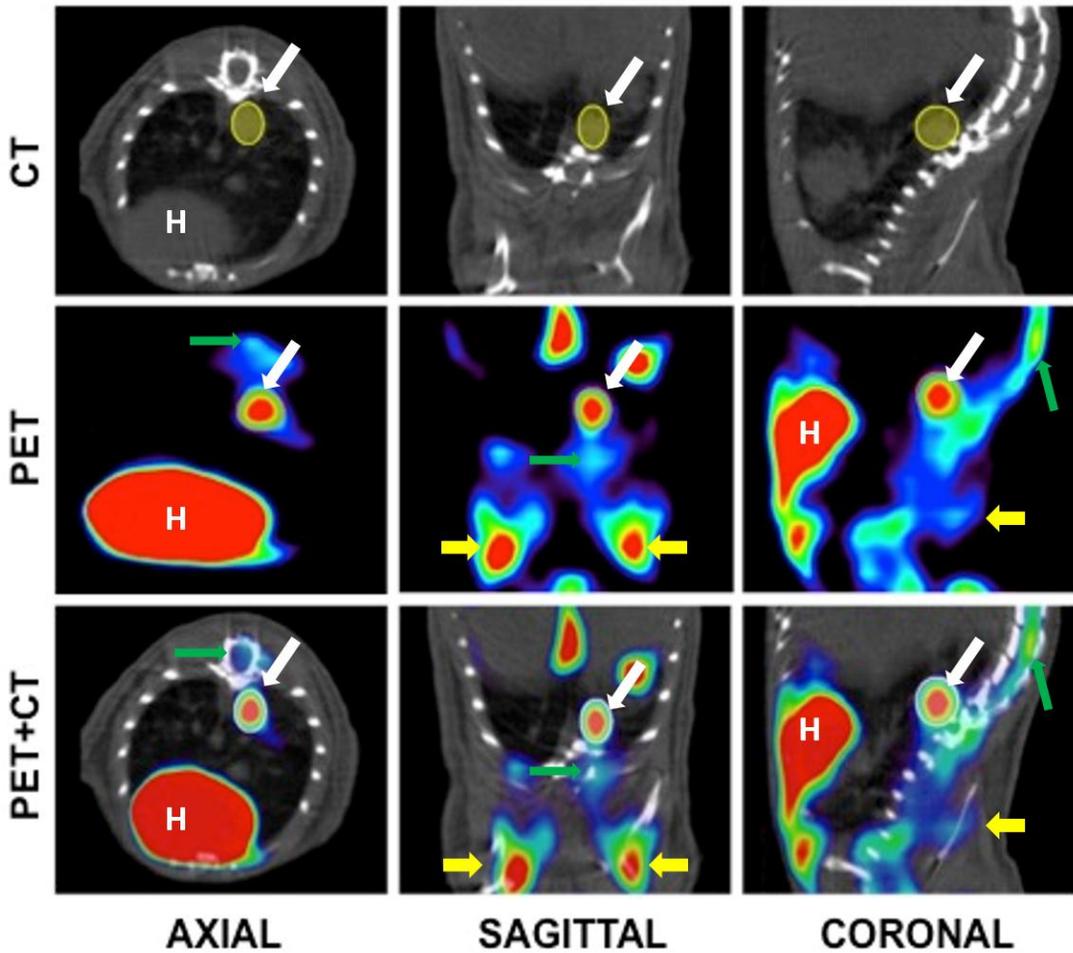


蜂巢

第7期
2024 11月



服务优质
共享开放
管理先进
运行高效





工匠精神

精益求精 追求卓越
传承弘扬 专心专注



服务理念

团结敬业 协作奉献
奋进探索 求实创新

服务内容与形式

蜂巢

2024/11



委托
检测

仪器
共享

项目
合作

技术
培训

科研
咨询



平台
管理

平台
建设

实验
教学

人才
培养

技术
研发



- 公共平台动态
 - 基于LC-MS/MS技术测定人体类固醇激素 1

- 前沿科技
 - 皮肤系统相关自免疾病动物模型 3
 - 浅析CLDN18.2靶点药物开发的非临床评价体系 5

- 实验技术
 - 肿瘤研究项目中的大小鼠的人道终点指导 6
 - 巨噬细胞流式检测方案 8

- 成果展示
 - 中医药高含量筛选应用指南 9



蜂巢

2024/11



基于LC-MS/MS技术测定人体类固醇激素

分析测试室/潘凌云

类固醇激素 (steroid hormone) 又称甾体激素, 属于激素中的一大类, 其合成过程以胆固醇为前体, 通过各种代谢酶的参与, 在人体的肾上腺皮质、胎盘细胞的线粒体、平滑内质网和性腺中合成, 产生化学结构不同的C21、C19、C18骨架。甾烷母核由A、B、C、D 4个环以不同方式稠合在一起, 其中雄甾烷和孕甾烷的A环大多数含有4-烯-3-酮结构, 如睾酮、皮质醇、孕酮。类固醇激素的合成通路图如图1所示^[1]。

根据药理作用, 类固醇激素主要分为孕激素、皮质激素、性激素, 它们在人体的生长、发育、生殖以及维持体内环境稳定等方面起着重要的调节作用。激素通过在人体靶细胞上与受体结合而发挥作用, 具有极高的专属性^[2]。当体内类固醇激素水平下降时, 机体会产生严重的症候群, 甚至危及生命。因此, 临床上将类固醇激素水平作为较多疾病的诊断指标, 包括先天性类固醇代谢紊乱 (如先天性肾上腺增生、先天性发育障碍和先天性盐稳态失调等) 和获得性类固醇代谢紊乱 (如原发性醛固酮增多症、库欣综合征、艾迪生病、高雄激素血症及精神状态疾病) 等。

目前, 检测人体内类固醇激素的方法包括放射免疫测定法、酶联免疫吸附(ELISA)法、化学发光免疫测定法、气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS)法和液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法。其中, 质谱法在检测灵敏度和准确度方面具有明显优势, LC-MS/MS可以与高通量分析相结合, 是常规检测类固醇激素的理想工具。图2为8种类固醇激素的典型MRM色谱图。

1. 样品前处理

常用的样品前处理方法有蛋白质沉淀(PPT)、液液萃取(LLE)和固相(SPE)。近年来还出现了一些新的前处理方法, 如分散液液萃取、超声波辅助提取法和超分子萃取等。为了得到目标化合物高回收率, 将多种前处理方法相结合已逐渐受到关注^[1]。

1.1 蛋白沉淀

蛋白沉淀是通过在生物样品中加入沉淀剂使蛋白质变性沉淀, 然后将目标分析物从样品中提取出来的方法。Polson等^[3]对比了有机溶剂、酸、盐和金属离子4种蛋白质沉淀剂, 以评估不同种类沉淀剂的蛋白质去除效率, 在血清与沉淀剂体积比为2:1时, 乙腈、三氯乙酸、硫酸锌可分别去除92.0%、91.0%、96.0%的血清蛋白, 因此认为这3种沉淀剂具有较好的沉淀效果。

1.2 液液萃取

液液萃取应用相似相溶原理, 通过向待测样本中加入有机试剂, 将待测物从基质中萃取出来。在该方法中, 萃取剂的选择非常重要, 要求所选溶剂对目标化合物的溶解度较大, 且不与目标物发生反应, 常用的萃取剂有乙醚、甲基叔丁基醚、乙酸乙酯、正己烷等有机溶剂, 以及它们的混合溶剂。Keski-Rahkonen等^[4]使用2-甲基丁烷、乙醚、正己烷和甲基叔丁基醚进行LLE实验, 对比不同提取溶剂对雄激素和孕激素的提取效率, 结果表明, 甲基叔丁基醚作为提取剂对所有类固醇激素均能产生最佳的萃取回收率。

1.3 固相萃取

SPE是20世纪后期发展起来的一项分离技术, 利用填充吸附材料将液体样品中的目标化合物吸附, 与样品的基体和干扰化合物分离, 再用洗脱液洗脱, 以达到分离和富集的目的, 其适用于提取各种极性化合物。固相萃取柱的填料主要有离子交换、正相和反相等吸附材料。其中, 对于血清基质中的类固醇激素常用反相萃取柱以达到良好的分离效果。在线固相萃取可以减少样品量, 提高样品回收率和处理通量。

1.4 衍生法

化学衍生法是在分析物上加入易电离基团, 使更多的分析物带上电荷而进入质谱, 提高了离子化效率, 可获得更高的特异性和更好的灵敏度。常用丹磺酰氯衍生化雌激素, 用吡啶酸衍生化雄激素, 采用LC-MS/MS分析衍生化后的雌激素和雄激素, 其检测限均可达到10 ng/L以下^[5]。衍生化的缺点是难以自动化。近年来有学者通过改变前处

处理方式避免难以自动化的衍生化步骤，同样实现了雌激素灵敏度的增加。

1.5 基于新型材料的前处理方法

近年来,新型材料成功应用于人体内代谢物质、神经递质、癌症和药物的检测,各种材料吸附剂已被用于提取类固醇激素,包括分子印迹聚合物(MIP)、二氧化硅、多壁碳纳米管(MWCNTs)等。

2. 色谱质谱检测条件

常规的C₈和C₁₈键合硅胶反相色谱柱可实现大部分类固醇激素的完全分离。当需要分离同分异构体时,也有报道使用其他类型的色谱柱,如Zorbax-SB Phenyl 色谱柱对泼尼松龙和可的松实现了良好分离效果。流动相通常为较为常用的甲酸-水或者乙腈-水,并适当配比一定浓度的甲酸或者甲酸铵。

串联质谱在临床检测中占据主导地位,常用于类固醇激素分析的离子源包括电喷雾离子源(ESI)、大气压光化学电离离子源(APPI)和大气压化学电离离子源(APCI)等,其中ESI应用最广泛。

通常使用同位素内标法校正实验过程中的基质效应和样品损失。对于复杂的类固醇类物质检测,通常添加待测物的氘代同位素内标,由于其化学性质、存在环境和目标物类似,能够同步抵消实验过程中产生的损失,校正样品和检测过程中的不确定性,确保LC-MS/MS 定量结果的高准确度和高稳定性。

参考文献

[1]徐玲燕,杜娟,王伟,等.LC-MS/MS在临床内源性类固醇激素分析中的方法研究和应用进展[J].药物分析杂志,2018,38(07):1106-1115.
 [2]万薇,谢洁,屈子裕,等.基于LC-MS/MS测定人体类固醇激素的研究进展[J].质谱学报,2024,45(02):201-215.
 [3] Polson, C., Sarkar, P., Incledon, B., Raguvaran, V., & Grant, R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences,2003, 785(2), 263–275.
 [4] Keski-Rahkonen, P., Huhtinen, K., Poutanen, M., & Auriola, S. Fast and sensitive liquid chromatography-mass spectrometry assay for seven androgenic and progestagenic steroids in human serum. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2011, 127(3-5), 396–404.
 [5] Koal, T., Schmiederer, D., Pham-Tuan, H., Röhring, C., & Rauh, M. Standardized LC-MS/MS based steroid hormone profile-analysis. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2012, 129(3-5), 129–138.

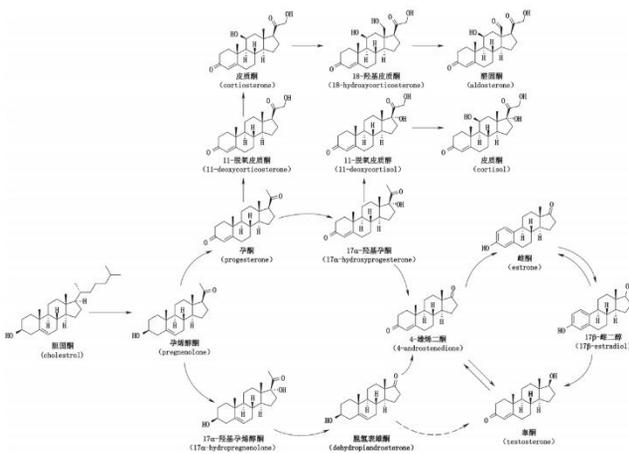


图1. 类固醇激素的合成通路图

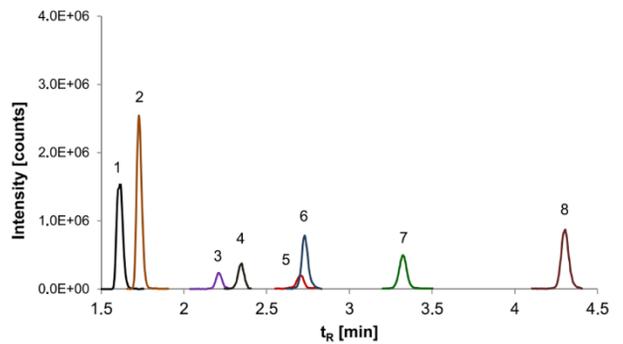


图2. 8种类固醇激素的典型MRM色谱图 (1) 皮质醇; (2) 皮质酮; (3) 11-脱氧皮质醇 (4) 皮质酮; (5) 17-OH-孕酮; (6) 睾酮; (7) 雄烯二酮; (8) 黄体酮



皮肤系统相关自免疾病动物模型

来源于百奥动物公众号

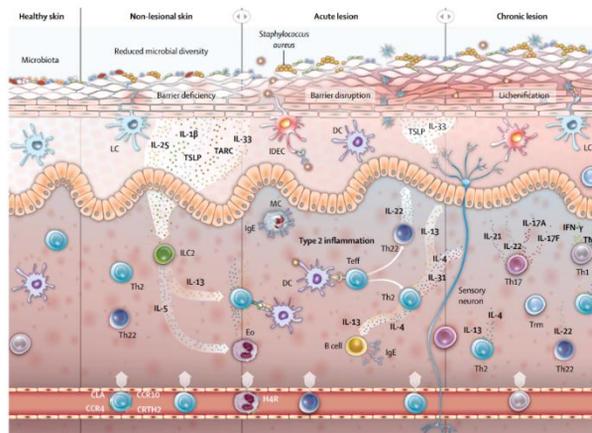
自身性免疫性疾病 (Autoimmune diseases) 是指机体的免疫系统错误识别机体健康细胞、组织或器官为免疫原, 引起不必要的炎症和组织损伤, 严重甚至会导致死亡。常见引起自身性免疫疾病的危险因素包括遗传、环境刺激等, 能影响皮肤、关节等机体多个部位, 其中与皮肤相关的常见自身性免疫疾病包括: 特应性皮炎、银屑病等。这些疾病不仅影响患者的皮肤健康, 还对生活质量产生深远影响。让我们一起深入了解这些疾病的概念、发病机制、治疗现状以及研究模型。

1 特应性皮炎

特应性皮炎 (Atopic dermatitis, AD), 是一种常见的慢性炎症性皮肤病, 临床上主要表现为剧烈瘙痒、复发性湿疹皮损。据相关统计, 特应性皮炎多发生于婴儿期及青少年期, 在儿童中的患病率为15%至20%, 在成人中为7%至10%。

目前的研究认为, 特应性皮炎的发病机制主要为: 皮肤屏障被破坏, 促使上皮细胞生成胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP)、IL-25和IL-33等细胞因子。激活II型先天淋巴细胞 (ILC2) 释放IL-13, 促使Th细胞向Th2, Th17和Th22细胞转换, Th2型细胞会产生IL-4, IL-13, IL-31等细胞因子, 其中IL-4, IL-13可促使B细胞产生特异性IgE, 导致肥大细胞脱颗粒, 从而促进炎症反应。而IL-31可激活神经元, 引起瘙痒-搔抓恶性循环。

Th22产生IL-22通过下调参与终末分化的基因, 诱导角质形成细胞分化缺陷和增厚棘层。此外, Th17细胞产生IL-17, 影响角质形成细胞粘附分子的表达, 导致表皮屏障功能障碍。



(Lancet. 2020 Aug 1;396(10247):345-360. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31286-1.)

目前对于特应性皮炎的临床治疗主要以局部皮质类固醇药物、免疫抑制剂、抗组胺药物以及生物药为主。其中类固醇药物主要以糖皮质激素为主, 具有较强的抗炎、抗过敏的作用; 免疫抑制剂主要包括甲氨蝶呤, 他克莫司等, 对免疫反应起到抑制作用。抗组胺药物主要为H1受体拮抗剂, 包括氯雷他定, 西替利嗪等, 可以抑制H1受体的活化, 起到抑制过敏反应的作用。

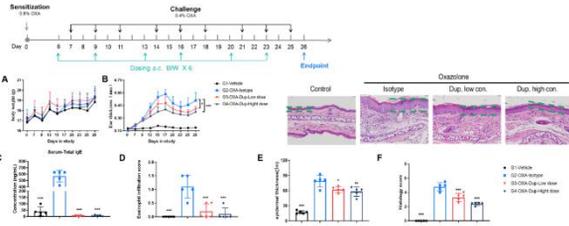
国际上对于特应性皮炎的研究, 主要集中于生物药研发。根据科睿唯安统计的结果看, 研发成功以及处于临床试验的抗体药物主要针对于IL-4, IL-13, IL-5, TSLP, OSMR以及IL-31等在特应性皮炎发病机制中具有重要作用的靶点。建立特应性皮炎建立动物模型对于相关药物的开发是至关重要的, 其中常用的造模药物为恶唑酮和卡泊三醇。

1.1 OXA诱导的特应性皮炎动物模型

恶唑酮 (Oxazolone, OXA) 属于半抗原, 能与皮肤组织蛋白结合成为抗原

复合物，由树突状细胞呈递抗原后，激活T淋巴细胞。当OXA再次进入机体后会立刻引发过敏反应。

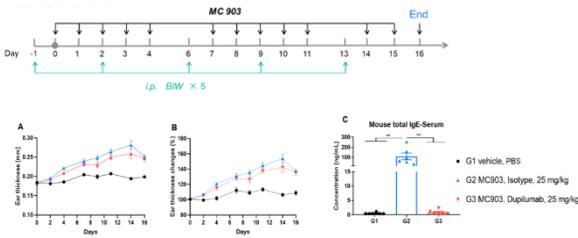
- Dupilumab在OXA诱导的B-hIL4/hIL4RA小鼠AD模型中的疗效评价



A. 治疗期间的体重变化; B. 治疗期间耳厚变化; C. 小鼠血清总IgE水平; D. 嗜酸性粒细胞浸润评分; E. 表皮厚度; F. 组织学评分。(A-B. 双因素方差分析; C-F. 单因素方差分析; * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001)。

1. 2MC903诱导的特异性皮炎动物模型

卡泊三醇 (MC903)，是一种维生素D3类似物，广泛用于治疗银屑病。过去研究发现，局部使用MC903可激发小鼠上皮角质细胞高表达TSLP，促进CD4+T细胞向Th2细胞分化及激活并释放炎症细胞因子，引起小鼠产生特异性皮炎表型。

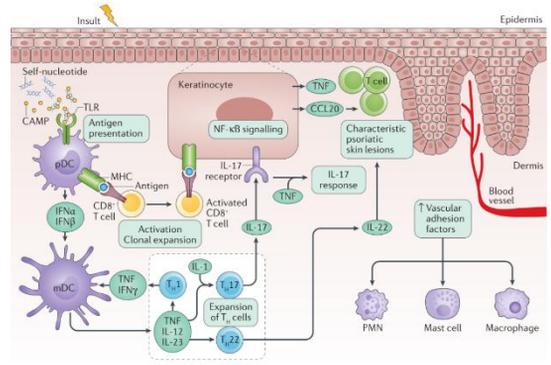


A-B. 治疗期间耳厚变化。C. 小鼠血清总IgE水平。数据表示为平均值 ± SEM。(A-B. 双因素方差分析; C. 单因素方差分析; ** p < 0.01)。

2 银屑病

银屑病 (Psoriasis)，是以表皮角质细胞增生为特征的皮肤病。其临床特征表现为皮肤红斑，银白色鳞屑及瘙痒等。根据相关统计，银屑病全球患病率约为2%至3%，在青少年和成人中的发生率更高。除了皮肤表现外，银屑病患者还可能合并关节炎，称为银屑病关节炎，这进一步增加了该病的复杂性和对生活质量的影

响。目前的研究认为，银屑病的发病机制机制较为复杂，涉及遗传因素、免疫异常和环境因素的相互作用，主要为：皮肤屏障功能受损，促进浆细胞样DC细胞呈递抗原，活化CD8+细胞，引起角质细胞NF-κB通路活化，分泌CCL20、TNF等促炎因子及趋化因子，促进皮肤炎症反应。浆细胞样DC细胞分泌的炎症介质干扰素能够引起下游mDC细胞分泌IL-12、IL-23等促炎因子，活化Th17、Th22等细胞，产生IL-17进一步促进炎症过敏反应。而IL-22能刺激角质形成细胞增殖，导致皮肤表层过度增生，形成银屑病特征性红色鳞屑斑块，促进银屑病皮损形成，并干扰正常的皮肤屏障功能，导致屏障损伤和水分丧失。这可能导致局部炎症加重和感染风险增加。



(Nat Rev Dis Primers, 2016, <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.82>)

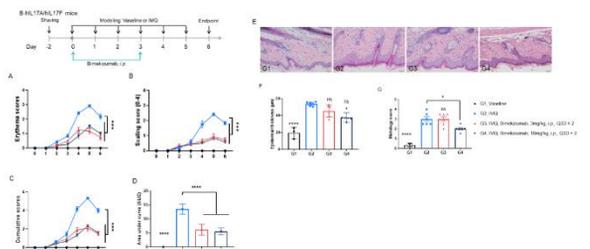
临床上，轻度、中度银屑病阶段治疗主要以局部使用皮质类固醇药物为主，如糖皮质激素丙酸氟氯噻，具有抗炎和免疫抑制作用。对于中度、重度银屑病患者，临床常用免疫抑制剂及生物制剂进行治疗。免疫抑制剂主要包括甲氨蝶呤，环孢素A，异维A酸等，通过干扰细胞增殖分化和免疫反应发挥治疗银屑病作用。

近几年来，靶向银屑病相关的生物制剂研发取得显著进展。现银屑病靶向抗体药物主要分为抗TNF-α药物、抗IL17A药物及抗IL-22、IL-23药物。其中如阿达木单抗、恩利昔单抗可抑制TNF-α水平，抑制炎症反应。如赛克珠单抗可抑制IL-17通路发挥治疗银屑病的作用，除此之外如乌司奴单抗，可通过靶向IL-12和IL-23抑制免疫反应，减轻银屑病症状[10-11]。根据科睿唯安统计的结果看，研发成功以及处于临床试验的抗体药物主要针对于IL-17，IL-23，IL-12以及TNF-α等在银屑病发病机制中具有重要作用的靶点。针对银屑病建立动物模型研究时常用的造模药物为咪喹莫特。

2.1 IMQ诱导的银屑病动物模型

咪喹莫特 (Imiquimod, IMQ) 是一种Toll样受体7 (TLR7)激动剂，可与免疫细胞的TLR7结合，刺激其产生IL-23及TNF-α和干扰素-γ等促炎因子，导致Th17细胞增殖分化，分泌IL-17等促炎因子，引起一系列炎症反应，并募集其他炎性细胞到皮肤，引起角质形成细胞过度增殖和异常分化，导致表皮增厚，形成鳞屑斑块。

- Bimekizumab在IMQ诱导的B-hIL17A/hIL17F小鼠银屑病模型中的疗效评价



A. 每日红斑评分; B. 每日脱屑评分; C. 各组合计得分; D. 各组合计得分曲线下面积; E. 背部皮肤H&E染色; F. 表皮厚度; G. 组织病理学评分。(双因素方差分析或单因素方差分析; * p < 0.05, *** p < 0.001, **** p < 0.0001)。

浅析CLDN18.2靶点药物开发的非临床评价体系

来源于集萃药康公众号

中国是胃癌高发国家，针对特定胃癌人群进行靶向治疗是精准治疗、提高胃癌患者疗效的关键因素之一。由于早期症状往往与很多常见的胃良性疾病症状类似，胃和胃食管交界处癌常在晚期或转移阶段，才得到诊断，在佐妥昔单抗III期临床研究中，约38%的晚期不可切除胃和胃食管交界处的成人患者CLDN18.2表达阳性。

CLDN18.2属于Claudins蛋白家族，是一种特异性的紧密连接蛋白，高度选择性表达在癌细胞中，使得它成为一个理想的肿瘤免疫靶点。Zolbetuximab通过在肿瘤细胞表面与CLDN18.2特异结合从而发挥抗肿瘤作用，这种结合作用通过激活两种不同的免疫系统途径——抗体依赖性细胞毒性（ADCC）和补体依赖性细胞毒性（CDC）诱导癌细胞死亡，达到肿瘤治疗的目的。适用于CLDN18.2靶向药物的非临床评价体系包含基于CLDN18.2高表达的同源肿瘤模型、CDX模型和PDX模型的评价体系。

1 同源肿瘤模型 (syngeneic model)

是将过表达human CLDN18.2的鼠源肿瘤细胞系接种至免疫健全的近交系小鼠而构建的肿瘤模型。由于宿主小鼠具备完整的鼠源免疫系统，所以能最大化模拟肿瘤微环境的真实情况。集萃药康拥有50余种鼠源细胞系，其中CT26、MC38和EMT6等常用细胞系已经进行了human CLDN18.2的过表达改造。在human CLDN18.2的过表达的鼠源细胞系上，同时进行其他人源化靶点的过表达（例如PDL1、CD47），即可用于双抗或联合用药的非临床评价。

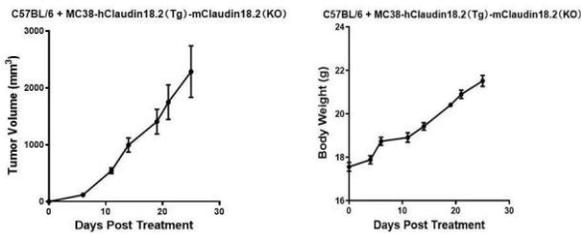


图1. 在C57BL/6小鼠皮下移植小鼠结肠癌细胞MC38-hCLDN18.2 (Tg) -mCLDN18.2 (KO) 的成瘤测试

2 CDX (Cell line-derived xenograft, CDX) 模型

通过将体外培养的CLDN18.2高表达的人源肿瘤细胞系移植到免疫缺陷小鼠（BALB/c-Nude、NCG等）体内而构建肿瘤模型，具有建模周期短、实验成本低、重复性高和肿瘤均一性好等特点，适用于早期药物筛选，药物靶点验证，药物剂量探索以及PK/PD研究等。目前集萃药康拥有10余种胃癌CDX细胞系，其中人胃癌细胞系NUGC4进行了hCLDN18.2的过表达改造，可用于靶向CLDN18.2的抗体类、CAR-T以及ADC类药物的临床前评价。

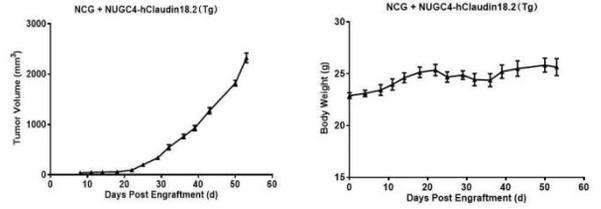


图2. 在NCG小鼠皮下移植人胃癌细胞NUGC4-hCLDN18.2 (Tg) 的成瘤测试

3 PDX (Patient-Derived tumor Xenograft model, PDX) 模型

是直接将CLDN18.2阳性的PDX样本移植到免疫缺陷小鼠体内进行建模，该模型能较完整地保持患者肿瘤原有的生物学特征、病理分型、分子标志物表达、基因突变类型等，可以更好地预测肿瘤对于不同药物的反应，和临床试验的结果有极高的相关性。集萃药康的PDX资源库中有40余例的PDX胃癌样本，可通过IHC筛选出CLDN18.2阳性的胃癌PDX用于临床前药效评价。

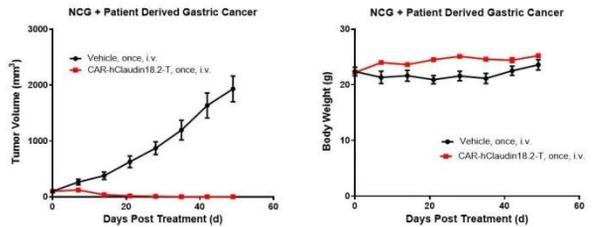


图3. CAR-T在NCG小鼠皮下移植人胃癌PDX样本模型中的药效学评价

与同源肿瘤模型相比，CDX和PDX的免疫缺陷模型无法较好反应出原始肿瘤微环境的特征及复杂性，而在免疫缺陷小鼠模型的基础上，进行免疫系统人源化就可以更有效地模拟人体免疫应答。集萃药康可通过将人外周血单个核细胞

(Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC) 或人外周血干细胞 (Hemopoietic Stem Cell, HSC) 移植到重度免疫缺陷小鼠NCG以及NCG二代品系体内，可在免疫缺陷鼠模型中重建出人源T、B、NK以及髓系相关的免疫细胞，更适用于肿瘤免疫、双特异性抗体以及ADCC效应功能等药物药效评价。

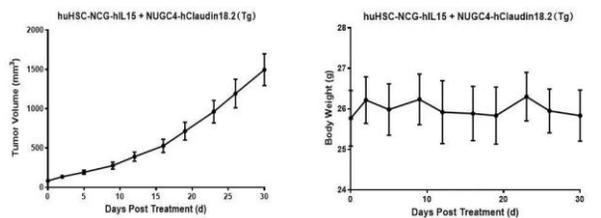


图4. 在huHSC-NCG-hIL15小鼠皮下移植人胃癌细胞NUGC4-hCLDN18.2 (Tg) 的成瘤测试

从药物的作用机制以及研发阶段出发选择合适的非临床评价体系是临床前药物研究的关键。



肿瘤研究项目中的大小鼠的人道终点指导 医学动物实验室

在肿瘤研究过程中，动物实验是理解恶性肿瘤的基本机制以及发现预防、诊断和治疗癌症的必不可少的一种途径。在实际实验过程中，我们不仅要考虑到项目本身的开展情况，也需要考虑到肿瘤对动物会有哪些的影响，也就是需要考虑到人道终点。选择合适的人道终点，将对动物的不良影响降到最低，是3R中“优化”的重要组成部分。

在Guide中对用于研究、教学和试验的动物的人道终点的阐述是：“尽管所有研究都应采用人道终点，但通常需要特别考虑的研究包括涉及肿瘤模型、传染病、疫苗保护试验、疼痛建模、创伤、单克隆抗体的产生、毒理学效应评估、器官或系统衰竭以及心血管休克模型的研究。”可见对于用于肿瘤项目研究中的实验动物，应该受到额外的关注。

为了节省成本和时间，建议先开展预实验，使用少量动物进行预实验，对于确定肿瘤传播动力学和模式、预测临床症状和确定人道终点都非常重要。我们应使用适当的生化和病理指标、工程报告系统或成像技术来确定疾病的开始。还必须根据动物的一般情况，以及可触到的肿瘤和特定体征（如后肢无力或瘫痪）进行评估。再开展正式实验。

1. 预实验

先开展预实验，用以确定肿瘤生长的完整程度，将有助于确定可靠和精确的人道终点。特定模型的人道终点还必须考虑到所述特定肿瘤模型的已知发病机制，并应根据经验定期审查。成像技术有助于为某些肿瘤模型开发提供更明确的人道终点。我们应尽一切努力，找出各种影响因素，并结合考虑到对动物福利的影响，尽早作出科学决定。故意以死亡作为终点，是不可接受的行为。

2. 正式实验项目

根据NIH guidelines，肿瘤瘤体重量应不能超过正常体重的10%，成年小鼠体表肿瘤任一方直径不可超过20mm，成年大鼠体表肿瘤任意方向直径不可超过40mm。（NIH, Guidelines for Endpoints in Animal Study Proposals(2019)）当动物出现肿瘤或被接种肿瘤后，应至少每周观察3次，并在肿瘤达到最大限度的80%时增加观察频次。需要评估的标准通常包括：

体况评分（BCS）、肿瘤客观尺寸标准、解剖位置、多发性肿瘤的发生率和肿瘤溃疡等。

2. 1体况评分（BCS）

BCS1: 瘦弱。骨骼结构明显突出，没有或仅有少量肌肉覆盖；椎骨明显：该评分水平的动物应立即安乐死；

BCS2: 偏瘦。椎骨可见；可轻易触摸到盆骨背侧。在这个阶段，随着动物从BCS3发展到BCS2，需要更仔细地观察。如果不会影响试验结果，则应开始支持性照顾（在笼内添加湿饲料，提供额外的水源，提供其他高热量的食物，如葵花籽或谷类食物）。如果一旦老鼠达到这分数就可以采集到相关数据，就可以安乐死。

BCS3: 匀称。背椎和盆骨背侧不突出，轻轻按压才可触及。这是理想的动物形态。

BCS4: 偏胖。脊柱节段不明显，用力按压才能触碰到椎骨。

BCS5: 肥胖。动物体型圆润而笨重，骨架被肌肉和皮下脂肪覆盖而不可见。处于这个阶段的动物需考虑饲喂低脂低蛋白的饲料来控制体重。

2. 2肿瘤的大小和位置

• 单个肿瘤

单个肿瘤的大小与肿瘤中心坏死、肿瘤处皮肤溃疡、活动障碍和擦伤有关。

单个肿瘤的动物，肿瘤平均直径在正常情况下，小鼠不应超过20厘米，大鼠不应超过40厘米；如果是用于治疗研究，分别不应超过1.5和2.8厘米。

• 复合肿瘤

与单个肿瘤体积相比，复合肿瘤的总容积可以比单个肿瘤的体积更大，且不应超过单个肿瘤的最大负荷。

• 肿瘤大小的测量和估算

动物体表实体瘤并不一定是规则形状，故在活体动物中描述肿瘤负担往往为估算值。某些研究用直径（d）描述肿瘤大小，而某些研究用体积（V）描述。用游标卡尺测量浅表肿瘤大小是传统和较为容易的方法（见图1），测量偏差可通过由同一名训练有素的测量人员参与整个过程来控制。

加利福尼亚大学洛杉矶分校医学院Mary M. Tomayko 和 C. Patrick Reynolds 于1989年发表

论文，文中介绍的肿瘤测量方法和多种体表肿瘤大小的估算公式被广泛使用[6]（见图2），其中较为简化的公式： $V = (W^2 \times L) / 2$ 常被使用。



图1 游标卡尺 (来自网络)

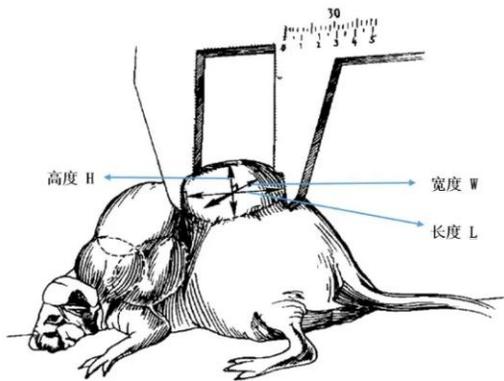


图2 皮下肿瘤测量方法说明。用卡尺测量长度（L，尺寸长的维度），宽度（W，尺寸较短的维度，垂直于长度所在平面，平行于动物身体平面）和高度（H，肿瘤上边界与动物身体之间的距离）

目前评估动物体内原位癌、全身性系统性淋巴瘤或转移瘤的肿瘤负荷还具有一定难度和挑战性。通过少量动物预实验对了解肿瘤转移模式和动力学、预测临床症状和确定人道终点很重要。生物标记物和循环系统中的癌细胞可用于评估淋巴瘤和白血病的肿瘤负担，实时成像也是一种非常有价值的辅助方法。适当的生化和病理学指标、人为设计的报告系统或成像技术都可应用于肿瘤发展过程的监测。

2.3 肿瘤溃疡

肿瘤出现溃疡（明显的开放性病变或结痂区域）不一定需要安乐死，但需要更频繁的监测或给予相应的治疗。溃疡性肿瘤的后续治疗方式取决于溃疡的大小和兽医的临床判断。

- 1) 点状（ $\leq 1\text{mm}$ ）溃疡，应每周至少监测3次，以防溃疡部位恶化。
- 2) 出现溃疡面（ $> 1\text{mm}$ ）应每周至少监测3次，并且必须汇报给兽医人员进行评估，并根据需要提供相应的治疗措施。

2.4 临床观察不可见的肿瘤

对于临床观察不可见的肿瘤，如白血病或骨骼、大脑、肺部肿瘤，无法进行实际的肿瘤大小测量，则在评判人道终点时应优先参考BCS和临床观察评估。预期的临床症状和这些症状的人道终点必须在项目方案中明确描述。在这种情况下，BCS评分系统可能最有帮助。

此外，对于肿瘤形成的最长时限需要在项目

方案中描述清楚，对于这类项目中的实验动物的临床症状评估应咨询兽医人员，把动物的健康和福利放在首位。

对于处于慢性疼痛或痛苦中的动物，如果不能通过止痛剂来缓解，除非这些人道终点的理由已经经过IACUC的同意，否则必须实施安乐死。

参考文献

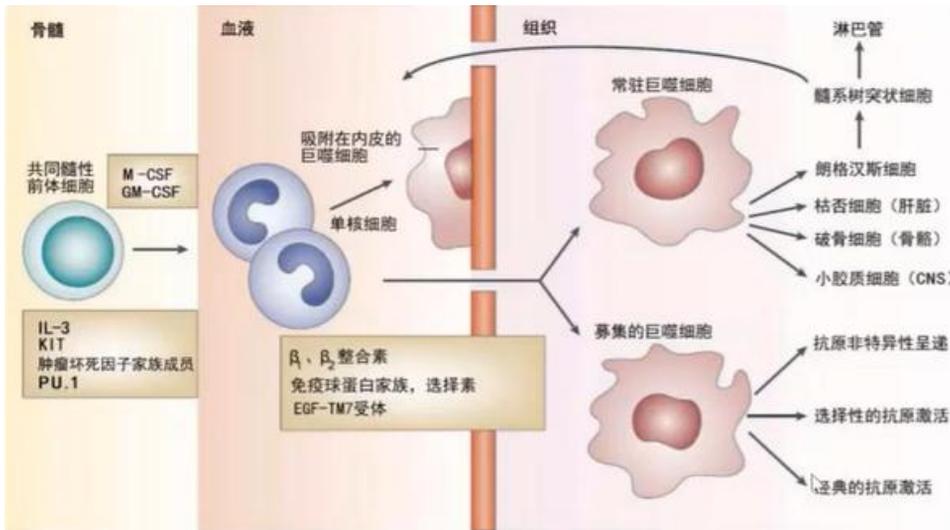
1. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer* (2010) 102, 1555 - 1577.
2. Guidelines on: choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching and testing. CCAC, 1998.
3. Guidelines for endpoints in animal study proposals. NIH, 2019.
4. UKCCCR Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia (Second Edition). UKCCCR, 1997.
5. 动物实验人道终点评审指南 (RB/T 173-2018)
6. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol* (1989) 24: 148-154.

巨噬细胞流式检测方案

病毒与免疫实验室/张幸

巨噬细胞 (Macrophages, Mac) 是一种广泛分布于全身组织的先天免疫细胞，属于单核吞噬系统。巨噬细胞具有三个基本的功能，即免疫调节、吞噬和抗原呈递。

1 巨噬细胞的来源与分化



巨噬细胞从骨髓形成、进入循环系统并且最终在不同部位分化。例如：在肺部时，巨噬细胞是肺部的“吸尘器”，肺泡巨噬细胞负责肺部的清洁；在肝脏里，被称为库普弗细胞 (Kupffer cell)，除了吞噬作用，还负责分解衰老的红细胞等等

Gordon, S. (2003) Alternative activation of macrophages. Nature Reviews Immunology

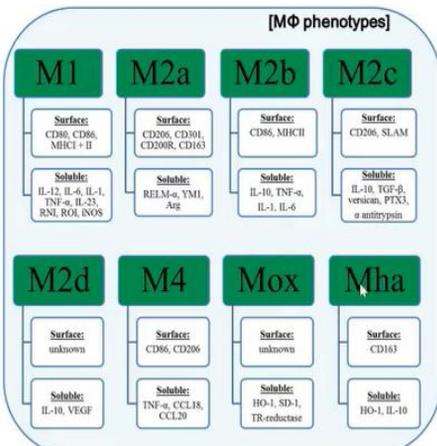
2 巨噬细胞功能分析检测

组织损伤后，巨噬细胞会经历明显的表型和功能变化，在组织修复的启动、维持和消退阶段发挥关键作用。巨噬细胞存在于大部分组织中，因此具有不同的功能。

根据巨噬细胞的活化状态和功能，它们可以分为M1型（经典活化巨噬细胞）和M2型（替代活化巨噬细胞）

2.1 表型检测

M1型巨噬细胞表达MHC II、CD80、CD86和CD16/32，分泌TNF- α 、IL-6和IL-12等促炎因子，以及CXCL9、CXCL10和CXCL11等趋化因子。**M2型**巨噬细胞高表达arginase-1 (Arg1)和CD206，分泌抗炎因子IL-10以及CCL2、CCL17和CCL22等趋化因子。



2.2 吞噬功能检测

在吞噬作用 (phagocytosis) 中，细胞将微生物等颗粒物内化，这一过程对于免疫反应的发生以及凋亡细胞的清除非常重要。研究吞噬作用的荧光标记探针包括 BioParticles 指示剂，一种荧光染料标记的细菌和酵母。

2.3 细胞因子检测 (流式)

目前常用的2种基于流式细胞术技术的细胞因子检测方法有流式胞内染色法和Cytometric Bead Array (CBA) 法。

差异对比见下表：

	流式胞内染色	CBA法
检测原理	流式	微球+流式
检测指标	同时检测2-4指标	多参数检测，18种常见指标
检测对象	组织、外周血等单细胞悬液	常规液体样本、细胞培养基上清、细胞裂解物
样本用量	10 ⁶ cells/tube	15-50ul/test
实验时间	4-6h	3.5h
目的细胞处理	不需要纯化目的细胞	需要纯化的目的细胞

中医药高含量筛选应用指南

高含量筛查 (HCS) 技术结合了自动化高速成像硬件和单细胞定量分析。它可以极大加速细胞荧光成像中的数据采集，是一种具有实用价值的研究技术，尤其适用于中医药研究。越来越多的实验室和平台，包括许多中医药院校，已经开始使用HCS系统。然而，这项技术在中医药研究中仍处于起步阶段，在相关概念、仪器配置和分析方法方面缺乏足够的经验。为了提高中医药领域研究人员对HCS的理解，本文由我们团队与浙江大学药学院共同撰写，根据在中医药研究的前期经验，总结了HCS的概念、软硬件配置、总体研究过程，以及HCS在中医药研究中的常见问题和相关解决方案，提供了几个研究实例和对未来前景的展望，旨在为HCS在中药研究中的应用提供技术指导。

1. HCS简介：概念、硬件和软件

HCS系统由显微成像硬件和图像分析软件组成；它可以被理解为一套专门的显微镜设备。其特点和优势体现在多通道、多井、多站点和多层图像的高速自动采集上。它配备了可以批量分析图像的软件，以获得分别以培养空、视野及单细胞、为单位的多维表型量化数据。

2. 中医药研究中的HCS工作流程

自动载物台、自动对焦模块和批量图像分析软件为HCS系统提供了高速自动图像采集和分析的显著优势。因此，它为研究中药的疗效和毒性以及中医理论的机制提供了强有力的工具和技术手段。这些包括从临床样本中寻找中医模式的分子标志物，评估中药的安全性和有效性，研究其物质基础和作用机制，以及了解中医理论的科学基础，如四气和五味。首先，构建疾病模型或从患者身上获取临床样本。其次，待检测的特定靶标被荧光标记。第三，使用HCS系统自动收集标记样本的多个图像。最后，对图像进行批量分析。此外，数据分析贯穿于各个方面，包括方法学研究过程中的实验质量控制、批量实验后的数据标准化和命中率选择。

3. 展望：HCS与微流体的集成

微流控技术搭载HCS是我们团队目前对于该技术的主要拓展方向。

微流体装置，也称为芯片实验室，控制微米级别的通道中的液体流动。例如，研究人员利用流体流动来诱导生理剪切应力，并发现了一种新的机制，通过这种机制，肿瘤细胞可以避免剪切应力并调节肿瘤细胞内血管。微流体技术具有小型化和高通量的优点；因此，它具有处理痕量样品和筛选药物组合的潜力。此外，细胞培养空间的结构可以在微流控芯片上定制，生物传感器设备，如微电极，可以集成在普通微孔板中实现一些无法实现的目的，同时确保高通量，如模拟血管屏障以研究其渗透性，在3D神经元培养物中进行无创电记录，或将味觉类器官与细胞外电位传感器阵列耦合以进行体外生物味觉模拟。

我们目前正在开发一种新型的实时成像微流体系统，该系统集成了HCS来研究中医药。特别是在数十个通道中同时进行独立的流体控制和动态给药，模拟了中药中多种成分的体内动态浓度变化。下图中描绘的示意图展示了我们开发的系统。该系统由配备特定软件和流体驱动模块的计算机调节，该模块通过施加压力来精确控制每个通道中的液体体积。流量监测和通信模块向计算机提供反馈，计算机进而调整流体驱动模块。中药成分分别在不同通道中进行控制。根据中药方剂的药代动力学，在体外模拟了成分的实时组合，并将其应用于荧光标记细胞。随后使用HCS记录和分

析荧光的变化。未来，更多的努力将集中在确保一个更简单、更通用的微流体平台上。随着微流体平台在许多实验室中的普及，基于微流体设备的HCS将继续为中医药研究做出重大贡献。

Acupuncture and Herbal Medicine

Guidelines for application of high-content screening in traditional Chinese medicine: concept, equipment, and troubleshooting

Xuechun Chen¹, Lu Li^{1*}, Mengou Zhang¹, Jian Yang¹, Chunming Liu¹, Yuhou Xu¹, Yang Yang^{1*}, Yi Wang^{1,2*}

Abstract
High-content screening (HCS) technology combines automated high-speed imaging hardware and single-cell quantitative analysis. It can greatly accelerate data acquisition of cellular fluorescence imaging and is a powerful research technique in traditional Chinese medicine (TCM). An overview of the concept, equipment and operation, including TCM scenarios, flow map of HCS systems, concepts, instrument configurations, and analysis methods. To improve the understanding of HCS among researchers in the field of TCM, this document will serve as a manual of HCS software and hardware details, the installation and practice, as well as common problems and related solutions of HCS in TCM research based on our hands-on research experience, providing several research scenarios and an outline of future perspectives, aiming to provide a technical guide for HCS in TCM research.

Keywords: High-content imaging, high-content screening, Traditional Chinese medicine.

Graphical abstract: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymbs.2024.100000>

Background
High-content screening (HCS) uses an automated microscope to perform multi-parameter imaging, provides quantitative data of cell populations in a high-throughput format, and saves considerable manpower and time in large-scale applications such as drug screening and systems biology for financial research. The general process of HCS includes disease modeling, biological sample acquisition, fluorescent labeling of certain targets associated with the disease of interest, image acquisition with an automated HCS system, fluid image analysis, and data statistics to obtain useful biological insights. HCS provides a large amount of cellular information and can be used to determine information that is difficult to acquire using conventional microscope reader-based biochemical detection methods, such as single-cell information, live-cell changes, and localization of the measured substances. HCS has developed rapidly since it was proposed, and the current commercial HCS hardware and software-integrated systems

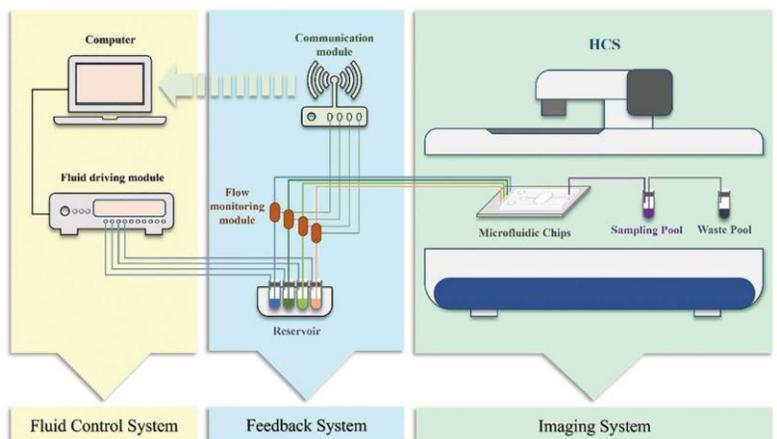
has become a popular basic instrument among pharmaceutical companies and has also been purchased by an increasing number of laboratories to accelerate biomedical research. HCS has good application prospects in traditional Chinese medicine (TCM) research. TCM theories on diagnosis and treatment are available, however, explaining Chinese medical theories with modern science is difficult in modern research of TCM. The use of biological phenotypes to explain the theories of qi and blood, cold and heat in Chinese medical theories has been occurred to a certain extent. Phenotypic changes are visible macroscopically, thereby revealing the joint action of various targets and pathways. The detection of phenotype is consistent with the scientific and holistic views of Chinese medical theories, which are expected to provide the scientific basis for the development and innovation of TCM theories in understanding and treating diseases. With the continuous advancement of new probes and other labeling technologies, it is possible to simultaneously obtain phenotypes of up to several different colored probes through HCS^{1,2}, which

*Corresponding author: Xuechun Chen, E-mail: chen_xuechun@zhu.com; Mengou Zhang, E-mail: zhangmengou@zhu.com

Received 10 August 2024; Accepted 10 February 2024

How to cite this article: Chen X, Li L, Zhang M, Yang J, Xu Y, Wang Y. Guidelines for application of high-content screening in traditional Chinese medicine: concept, equipment, and troubleshooting. *Acupuncture and Herbal Medicine* 2024;16(1):1-10. DOI: 10.1016/j.ymbs.2024.100000

Copyright © 2024, Elsevier B.V. All rights reserved. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY-NC-ND 4.0 International license), which is available to download and share the work provided it properly cited. The work cannot be distributed or used in a closed community without permission from the source.





网址:<https://kjsyzx.shutcm.edu.cn>
E-mail: kjsyzx_shutcm@163.com
上海市蔡伦路1200号科技创新楼6楼
邮编: 201203
电话: 021-51322387