

基于微流控芯片技术的荆芥诱导肺肿瘤细胞凋亡谱效关系研究

樊佳新¹, 王 帅^{1,2,3}, 孟宪生^{1,2,3*}, 包永睿^{1,2,3}, 李天娇^{1,2,3}

(辽宁中医药大学 1. 药学院, 2. 辽宁省组分中药工程技术研究中心,
3. 辽宁省现代中药研究工程实验室, 辽宁 大连 116600)

摘要: 为了进一步全面地阐明荆芥药材乙醇提取物中主要发挥抗肺癌作用的化学组成, 本文基于微流控芯片技术开展不同产地荆芥药材乙醇提取物的体外抗肺肿瘤药效学研究, 并通过 HPLC 方法建立 9 种不同产地荆芥药材乙醇提取物的指纹图谱, 将药效指标与指纹图谱的相关信息通过灰色关联度软件进行谱效关系分析, 采用 HPLC-Q-TOF/MS 的技术手段对其进行快速分析与鉴定。结果显示, 关联系数较大的色谱峰中第 19、6、16、11、18 号峰所代表的化合物为香叶木素、木犀草苷、木犀草素、橙皮苷、芹菜素; 第 10、12、20 号峰可能为柚皮素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷或槲皮苷、迷迭香酸甲酯或异鼠李素-3-木糖苷、5,7-二羟基-6,4-二甲氧基黄酮。该研究进一步明确了荆芥中发挥抗肺肿瘤作用的主要化学组成, 为荆芥药材的质量控制及中药复杂成分的药效物质基础研究提供方法学探讨和实验依据。

关键词: 荆芥; 微流控芯片; A549 细胞; 谱效关系; 灰色关联度

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 01-0126-06

Study of cancer cell apoptosis induced by *Schizonepeta tenuifolia* with microfluidic chip technology

FAN Jia-xin¹, WANG Shuai^{1,2,3}, MENG Xian-sheng^{1,2,3*}, BAO Yong-rui^{1,2,3}, LI Tian-jiao^{1,2,3}

(1. College of Pharmacy, 2. Liaoning Province Multi-Component Chinese Medicine Engineering Technology Research Center, 3. Liaoning Province Modern Traditional Chinese Medicine Research and Engineering Laboratory, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

Abstract: This study was designed to elucidate the chemical composition and anti-cancer effects of *Schizonepeta tenuifolia*'s ethanol extracts. Microfluidic technology was used in the study of *Schizonepeta tenuifolia* from 9 different geographic regions. The ethanol extracts were examined with HPLC to establish their Fingerprints in order to analyze the relationship between the spectrum and efficacy index through Grey Correlation software, and a rapid HPLC-Q-TOF/MS method was established. The result shows that chromatographic peaks of the 19, 6, 11, 16, 18th are the representative diosmetin, luteoloside, hesperidin, luteolin, and apigenin. The 10, 12, 20th peaks may be naringenin-7-*O*-glucuronide or quercitrin, rosmarinic acid or acetylcorynoline, and 5,7-dihydroxy-6,4-dimethoxy flavone. The major chemical composition of *Schizonepeta tenuifolia* was found to have the anti-lung-tumor effects. A new method was established for the quality control of traditional Chinese medicine.

Key words: *Schizonepeta tenuifolia*; microfluidic chip; A549 cell; spectrum effect relationship; grey correlation degree

收稿日期: 2016-08-24; 修回日期: 2016-09-20.

基金项目: “十二五”“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (2013ZX09507005); 辽宁省一般项目资助项目 (L2014361, L201605).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-411-85890185, E-mail: mxsvvv@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0466

微流控芯片技术以其高通量、高灵敏度、低消耗等优势在医学方面的应用越来越广泛, 是 21 世纪分析科学、生命科学及精密仪器等众多领域的研究热点^[1]。与常规 96 孔板相比, 微流控芯片技术用于体外药效评价具有高通量、高灵敏度、快速简便、低消耗等优势。根据文献^[2-4]调研及前期药效学实验研究发现, 荆芥对肺癌细胞具有一定的抑制作用, 但其化学成分与药效间关系并未得到合理解释, 故本实验在优化的工艺条件下^[5, 6], 将微流控芯片技术与荧光技术相结合, 通过灰色关联度的分析方法分析荆芥药材“谱效关系”, 并采用超高效液相色谱-质谱联用的技术对荆芥乙醇提取物进行了研究, 根据色谱保留时间、分子碎片峰、精确分子量、数据库以及对照品信息比对, 对其化学成分进行分析与鉴定^[7-9], 为深入研究中药材荆芥“谱与效关联”的质量控制模式及复杂体系的中药药效物质基础的研究方法提供一定的研究思路。

材料与方 法

仪器 精密注射泵 (LSP04-1A, 保定兰格公司); SU-8 2075 负性光刻胶; Sylgard184 型聚二甲基硅氧烷 (PDMS); 固化剂 (美国 Dow Corning 公司); JKG-2A 型光刻机 (上海学泽光学机械有限公司); HPDC-32G-2 型等离子清洗机 (美国 Harrick Plasma 公司); Nikon Eclipse TI 倒置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司); Agilent 1290 型快速高效液相色谱仪 (安捷伦公司); Agilent 6550 iFunnel Q-TOF 质谱 (安捷伦公司)。

试剂与药品 荆芥药材来源于不同地区的药房, 经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定本品为唇形科植物荆芥 (*Schizonepeta tenuifolia* Briq.) 的干燥地上部分, 样品信息见表 1; 荆芥总黄酮提取物 (乙醇回流提取后, 经 HPD-400 两次树脂纯化即得, 质量分数 > 90%); 细胞凋亡与坏死检测试剂盒 (Hoechst 33342 和碘化丙啶 (PI), 碧云天生物技术研究所, 批号: C1056-3); 香叶木素 (diosmetin, 批号: 151103); 木犀草苷 (icynaroside, 批号: 151111); 木犀草素 (luteolin, 批号: 150415); 芹菜素 (apigenin, 批号: 150915); 橙皮苷 (hesperidin, 批号: 160509), 均购于四川省维克奇生物科技有限公司。

芯片的设计与制作 实验设计的 PDMS-玻璃复合芯片通过软光刻、模注法以及氧等离子体键合三大技术手段制成^[10]。从上到下依次为液阀操控层、流体通道层和玻璃基片层。其中包括 3 个入口、5 个废液出口; 细胞培养区由 4×4 列细胞培养腔组成, 每列

设置 5 个复孔, 每个培养腔尺寸为 1.0 mm×1.2 mm 的椭圆形; 4 列培养腔共用一个废液口; 每列腔下方均设有宽约 100 μm 的弯曲管道, 以防止液体倒流。

Table 1 Sample information of *Schizonepeta tenuifolia* from different areas. Henan 1 herbs from the capital city of Zhengzhou; Henan 2 herbs from Shangqiu City, which was near the medicine market in Bozhou, the options for the herbs in order to explaining the difference in the same area

No.	Place of origin	Lot number
1	Anhui	150 901
2	Henan 2	151 008
3	Henan 1	150 502
4	Hebei	1 509 025
5	Yunnan	151 010
6	Sichuan	151 014
7	Hubei	14 010 833
8	Guangdong	151 123
9	Gansu	151 121

体外药效学评价 人肺癌细胞 A549, 常规培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内常规传代培养, 取对数生长期的细胞接种于芯片中, 待细胞贴壁后, 根据前期研究的相关数据结果 IC₅₀ 值, 用 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液将 9 种不同产地的荆芥乙醇提取物分别配制 1.0 mg·mL⁻¹ 的浓度, 以 0.2 μL·min⁻¹ 的流速经蠕动泵灌注注入芯片, 作用 48 h 后参照文献^[11]中方法用 Hoechst 33342 和 PI 染色对细胞进行双染, 检测不同产地药材的药效差异。

供试品溶液制备 分别称取 9 个不同产地的荆芥药材约 2.0 g, 经本实验室优选的最佳提取纯化工艺^[6]进行操作, 得到浸膏用乙腈充分溶解, 定容至 10 mL 量瓶中, 过滤 (0.22 μm), 即得供试品溶液。

色谱条件 Agilent Poroshell SB-C₁₈ 色谱柱 (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm), 流动相: 0.02% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 程序梯度洗脱: 0~10 min, 12% B; 10~18 min, 12%~13% B; 18~25 min, 13%~14% B; 25~30 min, 14%~15% B; 30~50 min, 15%~20% B; 50~80 min, 20%~30% B; 80~85 min, 30%~50% B; 85~90 min, 50%~100% B, 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 ℃; 进样量: 2 μL; 检测波长: 330 nm。

质谱条件 离子模式为电喷雾离子源 (Dual AJS ESI), 采用正、负离子检测模式, 毛细管电压 (Vcap) 为 4 kV, 干燥气体流速 (drying gas flow) 为 11 L·min⁻¹, 干燥气体温度 (drying gas temp) 为 250 ℃, 雾化器压力 (neulizer pressure) 为 30 psi (1 psi ≈ 6.9

kPa), 碎裂电压 (fragmentor) 为 365 V, OCT IRF V_{pp} 为 750 V, 准确质量数的校正液 (正离子模式为 121, 922; 负离子模式为 112, 1 033)。

灰色关联度分析 不同产地荆芥药材乙醇提取物共有峰 20 个。首先将影响整体行为的数据进行分列, 以反映系统药效行为特征的数据序列 (细胞的凋亡坏死率) 为参考数列, 即母序列, 以影响系统药效行为的因素数据序列 (荆芥药材的不同峰面积) 为比较数列, 即子序列。采用灰色关联度分析软件 (Grey Modeling_V3.0) 进行分析, 对于一个参考数列 X_0 有若干个比较数列 X_1, X_2, \dots, X_n , 根据以下公式计算各比较数列与参考数列在各个时刻 (即曲线中的各点) 的关联系数。

$$\gamma_{oi} = \frac{1 + |s_0| + |s_i|}{1 + |s_0| + |s_i| + |s_0 - s_i|} |s_0| = \left| \frac{\sum_{k=2}^{n-1} x_0^{oi}(k) + \frac{1}{2} x_i^{oi}(n)}{\sum_{k=2}^{n-1} (x_0^{oi}(k) - x_i^{oi}(k) + \frac{1}{2} x_i^{oi}(n) - x_i^{oi}(n))} \right|$$

$$|s_0 - s_i| = \left| \sum_{k=2}^{n-1} (x_0^{oi}(k) - x_i^{oi}(k) + \frac{1}{2} x_i^{oi}(n) - x_i^{oi}(n)) \right|$$

其中 $x_i^{oi}(n)$ 是 $x_i(n)$ 初值像的始点零化像。

Pearson 相关性分析 众所周知相关分析 (correlation analysis) 是研究变量之间密切程度的一种统计方法。而本实验为了进一步证明其谱效关联的正确性, 采用 SPSS 19.0 分析软件中 Pearson 相关系数进行佐证。每个色谱峰的峰面积以及药效指标均看作一个变量作出统计学推断, 密切程度的大小可由相关系数 (r) 来评价。

结果

1 芯片的设计与制作

三层复合式芯片中蓝色区域为液阀及气阀通道, 其中只有一个出口的为气阀, 两个出口的为液阀; 红色通道为流体通道, 流体通道层包括进样区、流体通道区和细胞培养区, 如图 1 所示。

2 荆芥乙醇提取物的体外药效学评价

使用倒置荧光显微镜进行拍照的结果如图 2 所示,

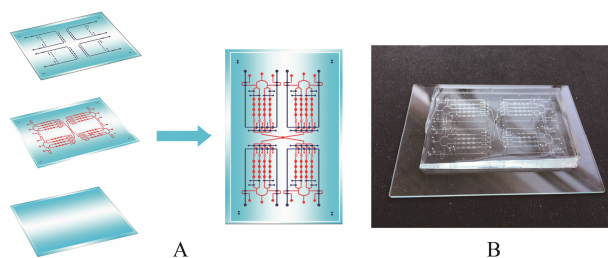


Figure 1 Schematic diagram of the chip. Red is the fluid channel layer; blue is the valve regulated layer (A); Pictorial diagram of the chip in picture B

通过 IPP 软件进行计算, 其凋亡坏死率如图 3 所示。

3 荆芥乙醇提取物的指纹图谱

取供试品溶液分析检测, 得到 9 个不同产地荆芥药材的指纹图谱, 如图 4 所示。

4 相关性分析

4.1 灰色关联度分析 不同产地药材色谱峰与其体外药效学评价指标之间进行相对关联度计算后的关联系数见表 2。

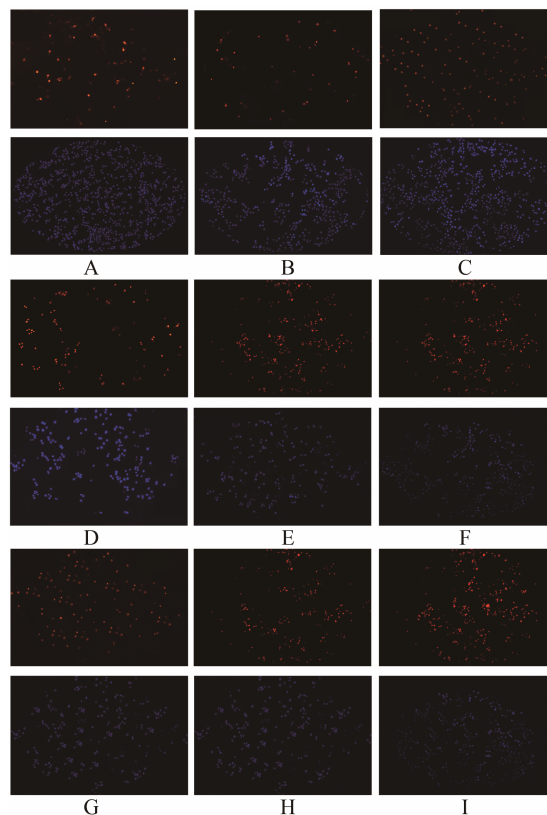


Figure 2 Hoechst 33342/PI double staining fluorescence detection results ($\times 100$). A, B, C, D, E, F, G, H and I represented Guangdong, Yunnan, Hebei, Gansu, Henan 1, Henan 2, Hubei, Sichuan, and Anhui, respectively

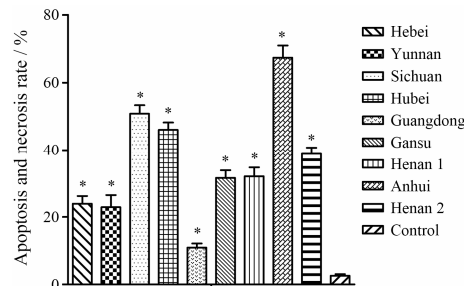


Figure 3 Effect of the extract of *Schizonepeta tenuifolia* from different regions on A549 lung cells apoptosis and necrosis rate. Apoptosis and necrosis rate % = (number of apoptotic cells + necrotic cells) / total cells $\times 100\%$. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs Control

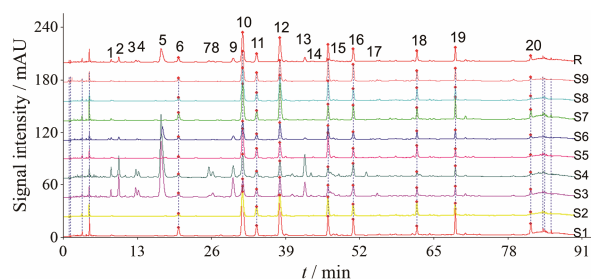


Figure 4 HPLC fingerprints of different origin. There are 20 chromatographic peaks in this picture which was numbered by Arabic numerals from 1 to 20, the specific information about them was interpreted in Table 2 and Table 4, Peaks 6: Icynaroside; 11: Hesperidin; 16: Luteolin; 18: Apigenin; 19: Diosmetin; 20: 5,7-dihydroxy-6,4-dimethoxy flavone. S1–S9 is from Anhui, Gansu, Guangdong, Hebei, Henan 1, Henan 2, Hubei, Sichuan and Yunnan, respectively. R represents a control map

从表 2 可知: 20 个共有峰代表的化学成分与抗肺癌作用都有较高的关联性。对抑制肺癌细胞增殖的关联度顺序为峰 19>6>10>12>20>16>11>18。峰 19、6、10、12、20 对体外抗肺癌作用的关联性较大, 最大值达到 0.9 以上。

4.2 Pearson 相关性分析 Pearson 相关性分析中密切程度的大小可由相关系数来评价。其统计学推断结果如下表 3 所示。

20 个共有峰代表的化学成分与抗肺癌作用具有

一定内在联系。Pearson 相关系数显示: 峰 19>6>10>20>12>16>11>18。与灰色关联分析的结果相比较, 20 号色谱峰与 12 号色谱峰的相关系数接近, 均为 0.5 左右, 无显著差异, 其推断结果与灰色关联度分析的结果存在一致性。

Table 3 Pearson correlation coefficients derived from the extract of different habitats *Schizonepeta tenuifolia*

Peak No.	Pearson correlation coefficient	Peak No.	Pearson correlation coefficient
1	-0.58	11	0.11
2	-0.62	12	0.56
3	-0.64	13	-0.56
4	-0.64	14	0.32
5	-0.62	15	-0.27
6	0.76	16	0.35
7	-0.27	17	-0.27
8	-0.63	18	0.05
9	-0.65	19	0.8
10	0.73	20	0.58

5 结构初步鉴定

通过 HPLC-Q-TOF/MS 质谱获得的二级数据与对照品及相关文献比对进行化学成分的快速鉴定, 最终确定了荆芥乙醇提取物中 5 种有效抗肺癌的化学成分和 3 种可能性成分, 其鉴定结果如表 4 所示^[12,13]。

Table 2 Peak area and the correlation coefficient derived from the extract of different habitats *Schizonepeta tenuifolia*. “-” means not detected

No.	Peak area (A)									Connection coefficient
	Anhui	Gansu	Guangdong	Hebei	Henan 1	Henan 2	Hubei	Sichuan	Yunnan	
1	10.1	-	94.3	106.3	-	21.9	15.4	-	10.3	0.627 4
2	-	-	330.4	350.1	-	49.4	-	-	-	0.500 3
3	-	-	183.3	161.1	-	-	-	-	-	0.500 6
4	-	-	144.9	118.9	-	-	-	-	-	0.500 8
5	-	-	2 006	2 204	-	393.5	-	-	-	0.500 0
6	191.5	64.8	103.3	90.2	35.3	62.3	179.2	78.5	74.3	0.973 1
7	-	-	-	270.3	-	-	-	-	-	0.500 8
8	-	-	164	154.8	-	-	-	-	-	0.500 7
9	-	-	542.4	316	-	117.1	-	-	-	0.500 2
10	1 440.5	697	549.3	712.7	844.1	510.1	1 063.3	926.1	853.3	0.961 9
11	244.6	231	195	185.7	232.6	135.8	232.9	198.5	197.9	0.709 6
12	1 062.1	550.5	485.1	422.4	412.2	422.7	1 121.8	667.8	532.3	0.948 5
13	-	-	355.8	559.6	-	50.1	-	-	-	0.500 2
14	395.8	389.7	196.4	227.3	552.8	278	323.5	418.3	457	0.660 1
15	-	-	-	156.1	-	-	-	-	-	0.501 4
16	325.4	233.5	281.1	294.9	183.3	172.1	289	252.6	343.3	0.755 9
17	-	-	-	93.4	-	-	-	-	-	0.502 3
18	144.4	240	128.3	84.7	215.9	130.7	119.3	211	169.9	0.662 3
19	373.6	176.7	143.5	145.7	124	135.8	321	186.2	180.4	0.988 3
20	179.1	45.4	95.5	52.7	26.9	56.1	144.5	56.3	50.7	0.919 2

Table 4 Preliminary examination of the effective component of *Schizonepeta tenuifolia*

Peak No.	<i>t</i> / min	[M-H] ⁻		Error (ppm)	Fragment ion (<i>m/z</i>)	Identification
		Cur. mass (<i>m/z</i>)	Calcd. mass (<i>m/z</i>)			
6	3.290	447.099 0	447.093 3	8.9	285.042 3	Icynaroside
10	4.182	447.096 6	–	–	271.065 5, 113.027 3, 175.028 7	Naringenin-7- <i>O</i> -glucuronide or quercitrin ^[12, 13]
11	4.442	609.189 0	609.182 5	7.7	301.073 2	Hesperidin
12	4.662	359.081 1	–	–	161.082 1, 197.049 5	Rosmarinate or acetylorynoline ^[12, 13]
16	6.374	285.045 2	285.040 5	8.5	217.052 3, 241.052 9	Luteolin
18	7.834	269.049 4	269.045 5	9.5	225.057 4	Apigenin
19	8.436	299.056 7	299.056 1	2.0	284.034 4	Diosmetin
20	10.813	315.088 9	–	–	300.065 5, 272.070 2, 168.007 5	5,7-Dihydroxy-6,4-dimethoxy flavone ^[12, 13]

讨论与结论

微流控芯片技术在中药领域的应用具有巨大的发展潜力,但在抗肿瘤类新药筛选领域还存在一定的不足,随着显微荧光影像分析、图像数据处理等各项技术的不断发展与进步^[14],本实验设计了集成有微阀结构的双层复合芯片,并将其首次用于荆芥药材的相关研究。蠕动泵在细胞可承受的剪切力条件下以 $0.2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速进行动态灌注,作用 48 h 后的药液消耗量还不足 0.6 mL,用量是传统 96 孔板技术的百分之一,为稀有药材的体外药效实验提供了一定可实施性。此外,芯片共用一个废液排出口,这样大大降低了实验的复杂性,且每列细胞培养腔都设计了弯曲形状的流阻结构,以保证液体不会倒流,这样的设计结合微阀的控制使得实验只需通过控制微阀的开关即可实现不同药液的同时给药刺激,减少了实验误差,节约了实验时间。并且微流体状态下更接近人体内部的微环境,更能真实反映其细胞形态。

中药药效是其内部各化学成分协同作用的结果,指纹图谱的特征必定与药效存在一定的关联。指纹图谱反映的是药材提取物的整体特征^[15, 16],所以在保证整体的前提下,其色谱峰与药效关联起来建立“谱效关系”具有一定的实际意义。本实验将中药指纹图谱技术与微流控芯片技术相结合,建立了 9 种不同产地荆芥乙醇提取物的指纹图谱,并通过灰色关联度分析方法探讨其与体外抗肿瘤药效之间的关系,为进一步深入研究其药效物质基础提供一定的数据依据。

从灰色关联度分析的结果得出 19、6、10、12、20 号峰为药效峰,并且 5 个色谱峰对体外药效学评价的影响最大,关联度均达到 0.9 以上,说明这 5 个成分对抑制肺癌细胞增殖起到重要的作用,为其“谱与效关联”的质量控制模式提供一定的数据支持;针对其药效峰,本课题组采用质谱、液质联用等

技术手段,对荆芥治疗肺癌的有效成分组成进行分析,揭示了荆芥药材抗肺癌作用的本质。

中药作为一种复杂的体系,必须充分考虑到中药固有的多效性、整体性、复杂性。而目前对于其物质基础的研究方法普遍认可的模式是将中药化学和药效学相结合^[13],此模式亦缺乏药理药效为导向,所以本研究在以药理药效为导向的前提下对其研究方法进行了优化,建立了以药理药效为导向的研究方法,即保证了药效的合理性,也保证了药材的整体性及复杂性。

综上所述,一方面本研究为微流控芯片技术在药物领域的应用拓宽了应用范围,为深入研究荆芥药效物质基础提供了科学依据;另一方面,对中药复杂体系药效物质基础的研究方法提供参考。

致谢: 辽宁中医药大学分析测试中心的全体老师在实验期间给予帮助,索轶平、郑义博、王焱、范婷、温聪聪同学给予本研究大力支持。

References

- [1] Luka G, Ahmadi A, Najjaran H, et al. Microfluidics integrated biosensors: a leading technology towards lab-on-a-chip and sensing applications [J]. *Sensors*, 2015, 15: 30011–30031.
- [2] Yan X, Liu HQ, Zou YQ, et al. Physiological activities and research advance in synthesis of flavonoids [J]. *Chin J Org Chem (有机化学)*, 2008, 28: 1534–1544.
- [3] Liu YH, Qi XX, Li H, et al. Anti-lung cancer effect of total flavonoids from *Camptosorus sibiricus* and their inhibition on lysyl oxidase [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2014, 45: 3573–3578.
- [4] Zang CJ, Deng YR, Wang Y, et al. Inhibiting effects of flavonoids from *Seriphidium santolium* on human lung carcinoma cell line A-549 [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2012, 18: 243–247.

- [5] Ma C, Wang S, Meng XS, et al. Study on purification technology of total flavonoids from *Schizonepetae* Herba with resistance of Caco-2 cells based on grey correlation degree analysis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2015, 46: 1615–1619.
- [6] Ma C, Bao YR, Meng XS, et al. Optimization of extraction process of total flavonoids from *Schizonepeta tenuifolia* based on analytical hierarchy process with dose-effect comparison method [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2015, 38: 381–385.
- [7] Kang LP, Zhao Y, Yu HS, et al. Identification of chemical constituents in Qiliqiangxin capsule by UPLC-Q-TOF/MS^E [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2011, 46: 1231–1236.
- [8] Rao YK, Wang M, Ding L, et al. Identification of the related substances in docetaxel injection by LC-MS/MS [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2012, 47: 779–784.
- [9] Xu SJ, Zhu YL, Yu JJ, et al. Simultaneous determination of 4 prenylflavonoids of Chuankezhi injection in rat plasma by LC-MS/MS [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2016, 51: 637–641.
- [10] Ma LD, Wang YT, Meng XS, et al. A cell migration model based on microfluidics and its application for baicalin pharmacodynamics research [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2014, 45: 352–357.
- [11] Yang XF, He CE, Tang RH, et al. A comparative study on the measurement of neuronal cell apoptosis by Hoechst 33342/PI double staining and TUNEL assay [J]. *Carcinog Teratogen Mutagen* (癌变·畸变·突变), 2014, 26: 180–184.
- [12] Zhang YH, Hu J, Shi RB, et al. Study on chemical constituents of *Schizonepeta tenuifolia* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2006, 31: 1118–1119.
- [13] Zhang YH, Zhou L, Shi RB, et al. Study on chemical constituents in spikes of *Schizonepeta tenuifolia* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2006, 31: 1247–1249.
- [14] Bhushan A, Senutovitch N, Bale SS, et al. Towards a three-dimensional microfluidic liver platform for predicting drug efficacy and toxicity in humans [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4: 1–6.
- [15] Wang J, Cao X, Ferchaud V, et al. Variations in chemical fingerprints and major flavonoid contents from the leaves of thirty-one accessions of *Hibiscus sabdariffa* L [J]. *J Clin Immunol*, 2015, 28: 707–715.
- [16] Xu L, Shi L, Xu L. Research methods on material basis of traditional Chinese medicine compound [J]. *Anhui Med J* (安徽医药), 2010, 14: 7–9.