

细胞膜色谱及质谱联用技术在中药活性成分筛选中的应用

王玉¹, 杨雪², 夏鹏飞^{1,3}, 杨蕊菁¹, 王玉霞¹, 杨飞霞¹, 樊秦¹,
武晓玉¹, 彭雪晶^{1,3}, 赵磊^{1,3,4*}

- (1. 甘肃中医药大学 药学院, 兰州 730000; 2. 北京中医药大学 药学院, 北京 102488;
3. 甘肃中医药大学 甘肃省高校中藏药化学与质量研究省级重点实验室, 兰州 730000;
4. 甘肃省道地药材质量标准化技术研究与推广工程实验室, 兰州 730000)

〔摘要〕 由于中药作用的整体性、成分和作用机制的复杂性,化学成分(群)作为中药及其复方制剂发挥治疗作用的物质基础,因此,采用多种方法分离分析中药及其复方中的化学成分一直是中药治病防病研究中一个有待解决的关键重要问题。传统方法存在操作繁琐、耗时耗事、浪费溶剂和样品的不可逆吸附等缺陷,并且分离过程中无法给出药理参数的基本信息,因而无法对活性成分进行高效准确定位。近年来从细胞层次研究药物成分与受体的结合为中药活性成分的筛选研究提供了一种新的途径。目前研究二者相互作用的方法之一—细胞膜色谱法(CMC),将现有色谱及质谱技术、细胞生物学与受体药理学结合起来,能够正确反映活性部位、活性成分与细胞膜及膜受体的相互作用,对复杂中药体系中有效部位筛选、活性成分的分离和高通量筛选具有独特优势。该文综述了 CMC 的原理、特点、中药活性成分筛选领域中的细胞膜模型及其与气相色谱-质谱(GC-MS)及液相色谱-质谱(LC-MS)联用的研究现状,并对其今后研究方法和未来的开发前景进行了探讨,为 CMC 在中药领域的深入研究和开发利用提供理论依据和实践指导。

〔关键词〕 细胞膜色谱; 质谱; 联用; 中药; 活性成分; 筛选
〔中图分类号〕 R284. 2;R289;R22;R2-031 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2020)08-0241-10
〔doi〕 10. 13422/j. cnki. syfjx. 20200513
〔网络出版地址〕 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20191126.1725.007.html>
〔网络出版时间〕 2019-11-27 08:53

Application of Cell Membrane Chromatography Coupled with Mass Spectrometry in Screening of Active Ingredients of Traditional Chinese Medicines

WANG Yu¹, YANG Xue², XIA Peng-fei^{1,3}, YANG Rui-jing¹, WANG Yu-xia¹,
YANG Fei-xia¹, FAN Qin¹, WU Xiao-yu¹, PENG Xue-jing^{1,3}, ZHAO Lei^{1,3,4*}

- (1. School of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;
2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;
3. Key Laboratory of Chemistry and Quality for Traditional Chinese Medicine (TCM) of Colleges of Gansu Province, Gansu University of TCM, Lanzhou 730000, China;
4. Gansu Province Engineering Laboratory for TCM Standardization Technology and Popularization, Lanzhou 730000, China)

〔Abstract〕 The chemical components (groups) contained in traditional Chinese medicine (TCM) and its compound preparations are the material basis for its curative effect, because of the integrity of the action of TCM

〔收稿日期〕 20190614(017)
〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(81660577);甘肃省中医药管理局科研项目(G2KLP-2014-7);甘肃省道地药材质量标准化技术研究与推广工程实验室开放基金项目(ddyc-2016-04);甘肃省中医药管理局科研项目(G2K-2014-77)
〔第一作者〕 王玉,在读博士,从事中药药效物质基础和质量标准研究,E-mail:704338647@qq.com
〔通信作者〕 * 赵磊,教授,博士生导师,从事中药药效物质基础和质量标准研究,Tel:0931-8762539,E-mail:zyzhyx@gszy.edu.cn

and the complexity of its compositions and mechanism. The separation and analysis of chemical constituents in TCM and its compound prescriptions by various methods is always a key problem to be solved in the research of disease prevention and treatment of TCM. The binding of drug molecules to receptors at the cellular level was explored to provide a new idea for the screening of active components of TCM or its compound preparations. Traditional methods have some drawbacks, such as cumbersome operation, time-consuming, waste of solvents and irreversible adsorption of samples. The basic information of pharmacological parameters cannot be given in the separation process, and the active ingredients cannot be efficiently and accurately located. At present, cell membrane chromatography (CMC), one of the methods, is used to study the interaction between drug molecules and receptors, and can combine the existing chromatography and mass spectrometry technology, cell biology and receptor pharmacology, and correctly reflect the interaction between active parts, active components and cell membrane and membrane receptors, so it has unique advantages in screening effective parts, separation of active components and high-throughput screening from complex TCM system. The principles and characteristics of CMC, the cell membrane model in the field of active ingredient selection of TCM and its research status in combination with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) were reviewed, and its development prospects and future research methods were discussed, which provides theoretical basis and practical guidance for the research and utilization of CMC in the field of TCM.

[**Key words**] cell membrane chromatography; mass spectrometry; combination; traditional Chinese medicines; active compounds; screening

中药用药历史悠久,药理作用多样且药效显著。根据相关报道中药能够通过另一种新型的方式改善人体健康,减少化疗药物的副作用和不良反应的发生,因而在世界范围内得到越来越多的接受和关注,已被广泛应用于各种疾病的预防和治疗中^[1]。中药具有多成分,多靶点,多途径协同作用的特点,化学成分繁多,作用机制极复杂,因此寻找在中药复杂体系中对活性成分进行准确定位的分离分析方法在中药研究领域引起了广泛的关注^[2]。因此从药物分子对细胞膜的亲和性研究筛选中药活性物质的新方法不失为一种创新思路。细胞膜上分布有生物活性分子的高浓度靶点,大多数药物需要通过与生物大分子在各自的生物信号通路中的相互作用才能透过细胞膜发挥药理作用。因此,迫切需要寻找一种结合色谱分离技术研究药物或化合物与细胞膜固定相或其受体间相互作用的分离分析方法。细胞膜色谱法 (cell membrane chromatography, CMC) 作为一种新型生物活性亲和色谱技术,具有色谱分离和细胞膜活性双重特性^[3],其以细胞膜与色谱载体作为固定相,在体外模拟药物分子与细胞膜受体的相互作用过程,进而选择性地识别活性化学组分并与它们特异性结合,进而能够从分子水平上探讨中药作用机制。目前 CMC 已与多维色谱 (如二维液相色谱、气相色谱) 和高灵敏度质谱结合,可同时进行药物分离和活性筛选,并对中药提取物与受体亲和力

进行定性、定量分析,具有特异性、稳定性、简捷性和可重复性^[3],已被广泛用于分析、分离和制备生物活性物质、筛选活性化合物、研究药物与细胞受体的相互作用,有助于阐明生物转化、构效关系及药物作用机制等^[4]。本文综述了 CMC 的原理、不同细胞膜类型在中药活性成分领域中的应用及其与多维色谱和高灵敏度质谱的结合在中药等复杂体系活性成分筛选主要领域的应用情况,以期为 CMC 的进一步发展以及在药物高通量筛选领域的拓展应用提供思路。

1 细胞膜色谱的原理和特点

细胞膜是由脂质双分子层构成,含有嵌入的受体、离子通道和酶,这些会参与细胞信号传递,与周围细胞和组织进行信息传递、交流、分析、综合,维持机体内外环境的平衡从而实现生命活动^[5]。相关研究表明,细胞膜上的受体、离子通道能选择性的识别药物中活性成分并与之特异性结合,通过影响细胞内第二或第三信使分子导致一定的生物效应,最终产生药理作用^[6]。CMC 通过将组织活体细胞膜或培养细胞固定在特定的载体表面上制备成细胞膜固定相 (cell membrane stationary phase, CMSP),最大限度地保持了细胞膜的完整性、膜受体的空间结构、周围环境及生物活性。

局限于传统的色谱分离技术不是以活性为先导,只能分离得到稳定的单体有机化学成分,分离的

目的性不强、周期较长、工作冗繁等,CMC 与传统色谱相比能够便捷地模拟药物与受体在动态系统中的相互作用的过程,对药物与受体亲和力进行定性和定量分析,同时对结合状态的药物进行色谱分离、活性筛选及药物鉴定^[2]。药物与细胞膜及膜受体相互作用的特征如特异性、饱和性、可逆性、竞争性等都可采用色谱的各种表征参数进行定量分析。CMC 的检测结果与常用的药物与受体相互作用的研究方法有较为理想的相关性,进而 CMC 正逐渐成为初步研究配体与受体相互作用的可靠替代技术,在天然活性成分的筛选,受体配体结合及新药研究中占有独特的优势。

2 不同 CMC 模型在中药活性成分筛选中的应用

近年来,不同细胞膜模型和活体细胞已被广泛用于中药及中药复方活性成分的筛选和中药注射剂的安全性评价等方面,其中包括肿瘤、心血管疾病、糖尿病及炎症反应等多种慢性疾病。以下将从中药药理作用、细胞膜类型及化学成分等方面对 CMC 的应用研究进行阐述。

2.1 肝细胞 付锦楠等^[7]采用 HL-770 肝细胞构建肝细胞膜色谱,筛选得到地黄中具有抗肝损伤的活性成分麦角甾苷和吉奥诺苷 B₁,并验证了其对 H₂O₂ 诱导肝细胞损伤的保护作用。洪敏等^[8]运用肝细胞萃取-HPLC 分析法进行栀子中保肝成分栀子苷的分离分析。徐文博等^[9]通过肝细胞亲和-HPLC 法体外筛选三七总皂苷(PNS)中特异性亲和的 2 种降脂成分人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Rg₁,并采用体外肝细胞脂肪变性模型对 PNS 中亲和成分的降脂活性进行评价。此外,肝细胞模型也逐渐用于筛选中药复方中具有多种生物活性的化学成分,如华永庆等^[10]采用肝细胞膜固相化色谱法特异性结合茵陈蒿汤中具有抗肿瘤细胞的活性成分,并且验证了活性成分对人肝癌细胞株 SMMC-7721 和人肺癌细胞株 A549 具有显著的抑制作用。ZHANG 等^[11]利用肝细胞固相色谱法筛选当归补血汤中能与肝细胞特异性结合的成分,采用 HPLC-EI-TOF-MS 进行分析,得到 9 种可能具有活性的成分。

2.2 血管平滑肌细胞 血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMC)是血管壁中层的主要细胞类型,具有高度特化性,主要参与血管壁形成^[12]。YANG 等^[13]构建原代大鼠胸主动脉 VSM 细胞膜色谱(VSM/CMC)固定相模型,筛选得到五味子中具有扩张血管成分的活性成分去氧五味子苷(DSD)和五味子素 A(STAS),并通过体外实验证实 STAS 和

DSD 能剂量依赖性地放松 KCL 预收缩的大鼠胸主动脉。代冬冬等^[14]利用原代培养的血管平滑肌细胞制备成细胞膜色谱柱,与 GC-MS 联用,构建了一种快速识别-分离-鉴定中药复杂体系中活性成分的分析模型,并用以筛选白芷和蛇床子超临界提取物(SFE)中的活性成分,通过比较细胞膜模型筛选前、后的出峰个数及峰面积百分比发现白芷筛选之后减少至少 8 个峰,蛇床子经过筛选之后仅变为 1 个峰。王艳微等^[15]采用大鼠血管平滑肌细胞膜色谱模型(VSM-CMC)结合液相色谱-质谱(LC-MS)离线分析佛手中舒张血管的有效成分佛手柑内酯。

2.3 表皮生长因子受体 吕艳妮等^[16]利用表皮生长因子受体(EGFR)细胞制备细胞膜色谱柱,通过十通切换阀与 HPLC-IT-TOF-MS 联用构建成 2D 在线联用系统用于筛选射干中作用于 EGFR 的抗肿瘤活性组分次野鸢尾黄素。王嗣岑等^[17]也建立 EGFR/CMC-online-HPLC/MS 系统快速筛选出中药独活中抑制 HEK293/EGFR 细胞增殖及 EGFR 表达的活性成分,经鉴定为蛇床子素,同时发现其具有与对照药物达沙替尼相同的色谱保留特性。ZHAN 等^[18]利用 EGFR/CMC 研究配体与 EGFR 的相互作用,评价配体与 EGFR 的亲和力,并以抗肿瘤药物阿法替尼为对照分析 EGFR 上特定结合位点发生的相互作用。结果表明,2 种天冬氨酸衍生物 TPD7、HMQ1611 和阿法替尼在 EGFR 上的单个共同结合位点上可能存在直接竞争,TPD7 的抑制作用高于 HMQ1611,而 TPD7 和 HMQ1611 对 HEK 293/EGFR 细胞的抑制作用较为相似,表明 TPD7 可能是一种新型的高表达的肿瘤阻滞剂^[19]。HAN 等^[20]构建 EGFR 细胞膜模型结合二维液相色谱技术从中药细辛中筛选出具有抗肿瘤作用的活性成分细辛酯素,并通过体外实验证实抗肿瘤药物吉非替尼和细辛酯素剂量在 0.10 ~ 102.4 mol·L⁻¹ 均能抑制高表达的 EGFR 细胞的生长。

2.4 心肌细胞 YANG 等^[21]建立了心肌细胞膜色谱(CM-CMC)与 LC-MS 相结合的离线分析方法,用于筛选中药北五味子、南五味子中能显著降低心肌缺血再灌注损伤大鼠的心肌梗死活性成分 DSD 和 STAS。岳宣峰等^[22]将家兔心肌细胞膜与硅胶载体结合制成 CM-CMSP,通过对比川芎水提液、醇提液和 CM 上已知受体的部分激动剂和拮抗剂在心肌细胞膜色谱柱上保留特性的对比进而筛选川芎提取液与心肌细胞膜受体相互作用的主要活性成分。李明华^[23]用包埋在大孔硅胶上的活性兔心肌细胞膜为

固相萃取柱的填料,制成细胞膜固相萃取柱后将能与细胞膜上受体结合的朱砂七水溶性提取液中的化学成分保留在固相萃取柱上,再经不同浓度的磷酸盐洗脱下可能与兔心肌细胞相结合的活性成分。

2.5 白细胞 LI 等^[24]将兔白细胞膜(WBCM)固定在二氧化硅载体表面制得白细胞膜色谱(WB-CMC)模型,以紫杉酚为模型分子,筛选出中药白术中作用于 WBCM 和 TLR4 靶点的活性成分白术内酯 I。同时采用正、反相色谱分离超临界白术根状茎提取液后利用 WB-CMC 对其提取液中具有抗炎活性的主要化学成分白术内酯 I 和烷烃类成分进行分离^[25]。诸多研究表明构建的 WB-CMC 可以更好地在体外模拟活性成分与白细胞膜及膜受体相互作用,用于特定靶标的作用成分和作用特性筛选研究。

2.6 β_1 -肾上腺素受体(β_1 -AR) 有研究将高表达 β_1 -AR 水平的仓鼠卵巢细胞制成 β_1 -AR/CMSP,并结合 UPLC-MS 系统对中药白术提取液保留组分进行分离鉴定,实验结果表明从白术中分离的异欧前胡素能够以类美托洛尔阳性对照药物的方式作用于 β_1 -AR^[26]。XUE 等^[27]采用 β_1 -AR/CMC 与 UPLC-MS 相结合的离线分析方法对吴茱萸中的 β_1 -AR 抑制剂类化学成分进行识别、分离和鉴定,筛选出潜在的 β_1 -AR 拮抗剂芦荟碱和吴茱萸碱为。YUE 等^[28]建立了一种高效表达的 β_1 -AR/CMC-UPLC-MS,用于黄连抗心肌损伤成分的筛选,结合 UPLC-MS 系统对 CMC 柱保留的馏分进行分离鉴定,得到能够抑制 β_1 -AR 的活性成分黄连碱,进一步证实黄连碱具有类美托洛尔样作用。

2.7 血小板细胞 樊宏伟等^[29-30]用血小板细胞膜色谱模型选择性地结合中药丹参提取液和抗血栓脉络宁注射液中的活性成分,将结合的活性成分从血小板细胞膜中洗脱出来后用 HPLC 对这些成分进行解析,分离得到包括丹参提取液中原儿茶醛等 6 个活性成分和抗血栓脉络宁注射液中 8 个活性成分。闫玉梅^[31]建立了血小板细胞膜色谱联用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 方法,用于高通量筛选中药丹参提取液中作用于血小板 P2Y12R 的抗血栓活性成分,实现了快速、高效地筛选、分离和鉴定丹参抗血栓活性成分。此外,WANG 等^[32]建立了人血小板细胞膜色谱联用 HPLC-DAD-ESI-MS/MS 方法筛选三七中潜在抗血小板聚集成成分的方法,发现 5 种可能与人血小板相互作用的化合物,其中 4 种已被鉴定。

2.8 HepG2 细胞 CHEN 等^[33]以 HepG2/CMC 模型作为二维色谱柱,建立了高稳定性、高选择性的

HepG2/CMC/整体柱/TOF-MS 体系,筛选出黄柏、苦参中的小檗碱(BBR)和四氢巴马汀(THP),这些活性成分以与吉非替尼相似的方式作用于 HepG2 细胞膜上的表皮生长因子受体区域,提示可能为潜在的抗肿瘤活性成分。JIA 等^[34]研发了一种新型在线综合 2D HepG2/CMC-HPLC-TOF-MS 系统用于快速筛选口服黄芩后大鼠含药血清中潜在的抗肝癌成分,并筛选鉴定出 3 种成分。此外,研究还表明综合二维 CMC 系统和 MATLAB 自编程序矩阵干扰消除策略对复杂生物样品中活性组分的体内筛选具有明显的优势,可应用于其他生物色谱模型。DING 等^[35]采用一种新型的(3-氨基丙基)三乙氧基硅(APTES)修饰硅胶,通过 APTES 与细胞膜上的氨基反应形成共价键将 HepG2 肝癌细胞膜固定在硅胶表面,筛选出丹参中对 HepG2 癌细胞增殖和凋亡均有效的活性成分丹参酮 II_A,丹参酮 I 和二氢丹参酮 I。

2.9 其他模型 除以上所述细胞膜模型外,还有诸多如 α_1A 肾上腺素受体、人胚肾 293 细胞及组胺 H1 受体等不同类型细胞膜色谱在中药活性成分的筛选研究中得到应用^[36-39]。见表 1。

3 细胞膜色谱联用质谱技术的应用

CMC 和 GC-MS 或 HPLC-MS 等多维色谱技术联用从作用于特定受体的成分群中筛选、分析和鉴定目标成分极大地减小了 CMC 在应用中出现的如 CMC 柱寿命短,灵敏度低,结构识别效率低,重复性差等缺陷,并且已被广泛用于中药活性成分的分离和膜受体与药物之间的作用特征研究中^[44]。

3.1 CMC-GC-MS 联用技术的应用 目前,国内较多研究已经建立了不同类型 CMC 柱用于筛选中药中的活性化合物,并用 GC-MS 对这些纯化组分进行了鉴定,进一步验证其分子作用靶点以检测其相关生物学功能。LI 等^[45]利用 PM-CMC 与 GC-MS 联用体系筛选鱼腥草中的抗炎成分甲基壬基甲酮(MNK),见图 1,通过对复杂样品 PM-CMC 模型的亲和识别得到了保留组分,然后利用 GC-MS 对保留组分进行了收集和分析,并对这些化学结构进行了鉴定,最后检测有效成分的药理作用。

此外,LI 等^[46]还利用富含 L 型钙通道(LCC)的 VSMC 制备固定相开发出一种新的生物色谱方法,并采用微萃取技术将 CMC 与 GC-MS 有机地结合起来用以筛选川芎挥发油中的活性成分洋川芎内酯 A 和藁本内酯。因此,近年来 CMC-GC-MS 分析方法具有简便、高效、稳定等优点,已逐渐应用于中药活

表 1 不同细胞膜类型在中药研究中的应用

Table 1 Application of different CMC models in studies of traditional Chinese medicines

细胞膜类型	药理作用	中药	化学成分	参考文献
肝细胞膜	抗化学性肝损伤	地黄	麦角甾苷	[7]
	保肝	栀子	栀子苷	[8]
	抗高血脂	三七	三七总皂苷	[11]
血管平滑肌细胞膜	扩张血管	五味子	去氧五味子苷	[13]
		蛇床子	蛇床子素	[14]
		佛手	佛手柑内酯	[15]
表皮生长因子受体	抗肿瘤	射干	次野鸢尾黄素	[16]
	HEK293/EGFR 抑制剂	蛇床子	蛇床子素	[17]
	抗肿瘤	TPD7		[18]
心肌细胞细胞膜	抗心肌缺血	五味子	五味子素 A	[21]
	扩张血管	白芷	欧前胡素	
		川芎	大黄素葡萄糖苷	[22]
		朱砂七		[23]
白细胞膜	抗炎	白术	白术内酯 I	[24-25]
β_1 -AR	β_1 -AR 拮抗剂	白术	异欧前胡素	[26]
		吴茱萸	芦荟碱和吴茱萸碱	[27]
	抗心肌损伤	黄连	黄连碱	[28]
血小板细胞膜	抗血栓	丹参	原儿茶醛	[29-31]
	抗凝血	三七	人参皂苷	[32]
HepG2 细胞膜	抗肿瘤	黄柏、苦参	小檗碱、四氢巴马汀	[33]
		黄芩口服液	黄芩素、黄芩苷	[34]
		丹参	丹参酮 II _A 、二氢丹参酮	[35]
白血病细胞	阻断白血病细胞增殖	青黛	靛玉红、色胺酮	[40]
人胚肾细胞	抑制血管生成	元胡	延胡索乙素、延胡索碱	[41]
α_{1A} 肾上腺素受体	松弛前列腺带	白花前胡	白花前胡素 A\B\C	[42]
人牙周膜细胞膜	治疗牙周炎	黄连	小檗碱	[43]

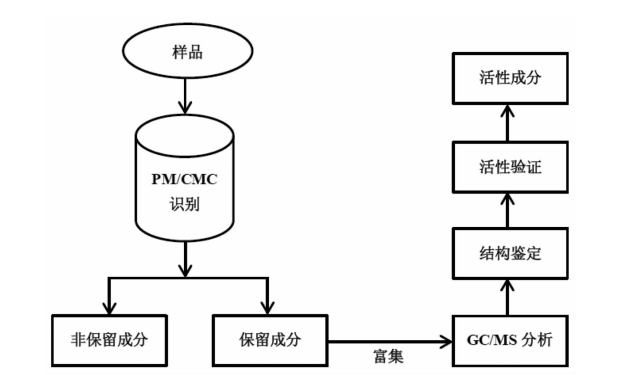


图 1 腹腔巨噬细胞膜色谱 (PM-CMC)-气相色谱-质谱 (GC-MS) 联用示意

Fig.1 Schematic diagram of PM-CMC-GC-MS method

性挥发性化合物的识别、分离和鉴定,见表 2。

3.2 CMC-LC-MS 联用技术的应用 对于沸点高、分子量大及热不稳定的化合物可采用 CMC-LC-MS 分析方法。GUO 等^[39]建立了 2D 组胺 H₁ 受体细胞膜色谱(H₁R-CMC)结合 HPLC-MS 法筛选中药郁金注射液中潜在的组胺激活成分,并对组胺 H₁ 受体上的潜在过敏成分进行了鉴定。如图 2 所示,在位置 A 将样品注入 H₁R-CMC 模型,H₁R-CMC 模型上的保留组分被富集到 ODS 富集柱(EC1)上,然后在位置 B 切换两个位置的十通阀后,将保留的部分从 EC1 中洗脱到 2D HPLC-MS 系统中进行色谱分离和质谱鉴定,最终筛选出组胺激活成分鱼腥草酸^[51]。

表 2 不同细胞膜色谱联用 GC-MS 系统在中药活性成分筛选中的应用

Table 2 Application of GC-MS system combined with different cell membrane chromatography in screening active components of traditional Chinese medicine

质谱系统	细胞膜固定相	中药	有效成分	参考文献
CMC-offline GC-MS	腹腔巨噬细胞 (PM/CMC)	白术/苍术	白术内酯 I	[45]
		鱼腥草	甲基壬基酮	[47]
CMC-MEPS-GC-MS	血管平滑肌细胞 (VSMC)	川芎	洋川芎内酯 A, 川芎内酯	[46]
CMC-GC-MS	人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞膜 (SH-SY5Y)	柴胡	柴胡皂苷 A, B ₁ , B ₂ , C, D	[48]
CMC-offline GC-MS	大鼠动脉细胞膜 (artery)	川芎	川芎内酯, 丁烯基苯丙酯	[49]
		白芷	欧前胡素, 异欧前胡素	[50]

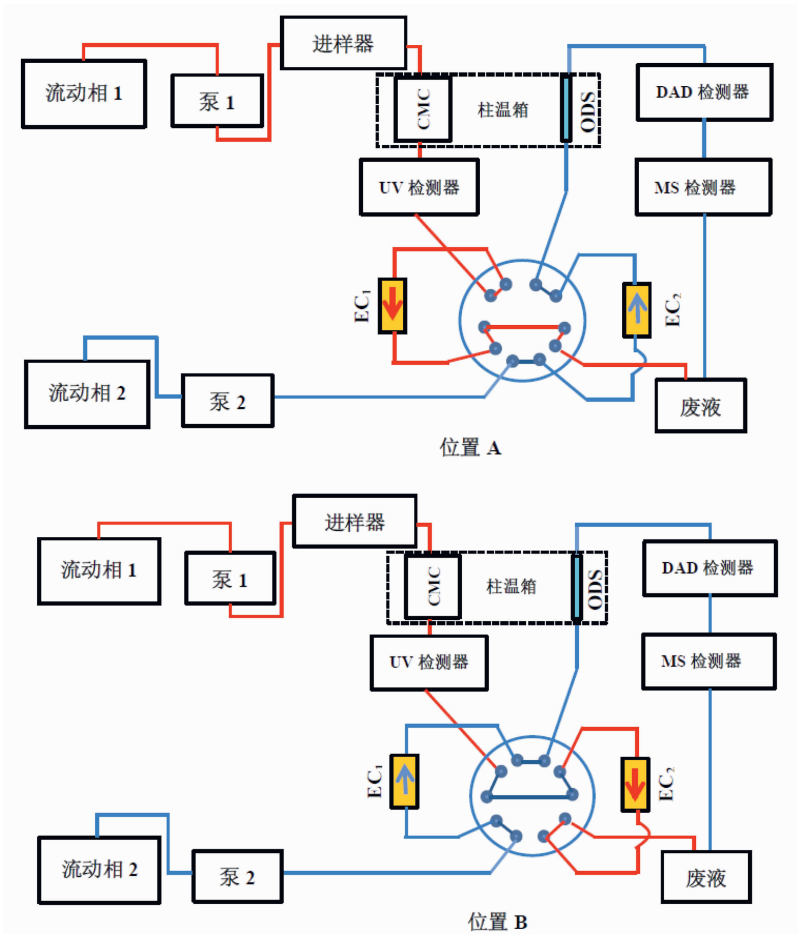


图 2 组胺 H₁ 受体细胞膜色谱 (H₁R-CMC)-高效液相色谱-质谱 (HPLC-MS) 联用示意

Fig.2 Schematic diagram of H₁R-CMC-HPLC-MS method

此外,郑华珠等^[52]采用固相萃取、神经元样 PC12 细胞膜固相色谱法富集补阳还五汤中特异结合神经元样 PC12 的效应成分,联用 UPLC-MS/MS 鉴定出 3 种特异结合成分,其他不同类型 CMC 联用 LC-MS 分析方法用于筛选中药复杂体系中活性化合物,见表 3。

4 细胞膜色谱技术存在的问题及对策

尽管 CMC 在中药研究中具有很好的应用前景,

但目前在其推广和应用方面也存在一些问题如其在应用过程中所面临的柱寿命短、稳定性差、重现性较差等。目前 CMC 在实际应用中多采用硅胶作为固定相载体,通过硅胶表面进行共价修饰,利用(3-氨基丙基)三乙氧基硅烷 (APTES)在硅胶表面键和醛基从而与细胞膜表面大量的游离氨基形成共价键,延长了细胞膜色谱柱寿命并提高其稳定性。另外本研究还拟对影响细胞膜色谱稳定性的一系列关键步

表 3 不同细胞膜色谱联用 LC-MS 系统在中药活性成分筛选中的应用

Table 3 Application of LC-MS system combined with different cell membrane chromatography in screening active components of traditional Chinese medicine

质谱系统	细胞膜固定相	中药	有效成分	文献
CMC-offline LC-MS /MS	血管平滑肌细胞膜 (VSM)	五味子	去氧五味子素, 五味子素	[13]
CMC-online LC-MS	高表达血管内皮生长因子 (VEGFR)	乌头	新乌头碱, 乌头碱, 次乌头碱	[53]
CMC-offline LC-TOF-MS	大肠埃希菌细胞膜 (CMAE)	麻疯树	阳离子抗菌肽 JCpep8	[54]
CMC-LC-MS	前列腺细胞膜	莲子心	连心碱, 异莲心碱, 荷花碱	[55]
		钩藤	去氢钩藤碱, 异钩藤碱, 钩藤碱	[56]
CMC-online LC-MS	A431 细胞膜 (A431) α_{1A} 肾上腺素受体 (α_{1A} AR)	板蓝根	总生物碱	[57]
			木兰花碱, 考洛芬	[58]
CMC-UPLC-MS	β_1 -AR	羌活	异欧前胡素	[59]
CMC-online HPLC-MS	腹腔巨噬细胞 (PM)	黄花菜	异黄酮	[60]
CMC-online LC-MS	嗜碱性粒细胞白血病细胞 (RBL)	双黄连注射液	黄芩苷	[61]
CMC-online LC-MS	人牙周膜细胞膜	黄连	小檗碱	[62]

骤进行考察,包括细胞破碎条件、细胞的用量等;在研究配体和亚型受体相互作用时,可采用质粒转染技术提高 CMC 稳定性、灵敏度及特异性;还可利用凝胶或其他多功能纳米材料作为细胞膜的载体,如 Fe₃O₄ 磁性纳米材料具有良好的生物相容性,可经量子点、金属或染料分子修饰而起到核磁共振成像的作用,其可增加细胞膜稳定性,使其不易破碎,减少不可控的膜损失。因此,建立多功能材料如微型/纳米色谱柱的细胞膜色谱多维分析系统是未来 CMC 方法学研究的方向。此外,CMC 作为体外特异识别与细胞膜受体相互作用的活性成分的系统,尚不能完全模拟机体复杂的环境,还需进一步完善模型,并利用药理学研究进行验证。

5 展望

近年来,由于中医药现代化和全球化的不断发展和推广,采用中药治疗疾病已越来越普遍,因此需要有效、准确定位的研究方法来筛选和分析具有药理活性的化学成分。CMC 在中药有效部位的筛选、活性成分的分离及药物受体相互作用研究等方面具有较高的特异性和工作效率,并且 CMC 与 GC-MS 和 LC-MS 联合使用建立了有效的“识别-分离-鉴定”中药复杂体系中的活性成分的分析模型,用于从复杂的生物系统中筛选作用于特定受体的生物活性成分,已在中药、天然药物等活性成分的高通量筛选研究中得到应用。随着 CMC 的不断完善和提高,其与蛋白组学分析方法、计算机辅助药物筛选及多功能新型材料等相互结合,极大地拓展了 CMC 技术在中药及其他研究领域中的应用,为从天然产物中

发现新型的药物提供了一定的理论和技术基础。

[参考文献]

[1] WANG D, DU X X. Interpretation of adverse drug reaction reporting and monitoring and significance of traditional Chinese medicine adverse drug reaction monitoring[J]. Chin J Chin Mater Med,2012,37(18): 2686-2688.

[2] 王新,薛晖,岳媛,等. 高表达 β_1 肾上腺素受体细胞膜色谱法靶向筛选夏天无中活性成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(18):65-68.

[3] 陈芳有,罗永明,吴样明,等. 亲和色谱技术在天然药物研究中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(11):230-234.

[4] HAN S L, ZHANG P, WEI F, et al. Screening active components acting on α_{1A} adrenergic receptors from agrimony using a Sprague-Dawley rat prostate cell membrane chromatography online coupled HPLC/MS method[J]. Anal Methods,2012,4(10):3351-3357.

[5] YANG X X, ZHANG Y L, ZHANG X X, et al. Cell membrane chromatography and its application in the analysis of bioactive ingredients of TCMs[J]. J Pharm Sci,2011,20(1):20-25.

[6] 王丽莉,张铁军. 细胞膜色谱法及其在中药活性成分研究中的应用[J]. 药物评价研究,2011,34(2):110-114.

[7] 付锦楠,张文萌,孙立新,等. 中药地黄中抗化学性肝损伤的活性成分研究[J]. 江西科学,2014,32(3):295-300.

[8] 洪敏,马宏宇,朱荃. 肝细胞萃取-HPLC 分析法的建

立及其在栀子保肝效应物质初步分析中的应用[J]. 中国中药杂志,2009,34(4):450-453.

[9] 徐文博,陈艺丹,周律,等. 肝细胞亲和-HPLC 法体外筛选三七总皂苷(PNS)抗肝细胞脂肪变性的活性成分[J]. 广东药科大学学报,2017,33(2):226-230.

[10] 华永庆,洪敏,陈文星,等. 茵陈蒿汤肝细胞结合成分对肿瘤细胞的影响[J]. 中药药理与临床,2010,26(6):1-2.

[11] ZHANG X, QI L W, YI L, et al. Screening and identification of potential bioactive components in a combined prescription of Danggui Buxue decoction using cell extraction coupled with high performance liquid chromatography [J]. Biomed Chromatogr,2008,22(2):157-163.

[12] ZHANG M J, ZHOU Y, CHEN L, et al. An overview of potential molecular mechanisms involved in VSMC phenotypic modulation [J]. Histochem Cell Biol,2016,145(2):119-130.

[13] YANG X X, WANG Y W, ZHANG X X, et al. Screening vasoconstriction inhibitors from traditional Chinese medicines using a vascular smooth muscle/cell membrane chromatography-offline-liquid chromatography-mass spectrometry[J]. J Sep Sci,2011,34(19):2586-2593.

[14] 代冬冬,侯晓芳,周明哲,等. 血管平滑肌 CMC-GC/MS 联用方法的建立[J]. 西北大学学报:自然科学版,2010,40:162-166.

[15] 王艳微,畅瑞苗,王新,等. 细胞膜色谱法与液相色谱-质谱联用筛选佛手的活性成分[J]. 中国中医药信息杂志,2013,20(8):66-68.

[16] 吕艳妮,付佳,贺浪冲,等. 细胞膜色谱在线 HPLC-IT-TOF MS 联用系统筛选分析射干中次野鸢尾黄素的抗 EGFR 活性作用[J]. 质谱学报,2017,38(4):425-432.

[17] 王嗣岑,孙萌,张彦民,等. 用高表达 EGFR 细胞膜色谱-HPLC/MS 联用快速筛选独活中抗 EGFR 活性成分[J]. 中国科学:化学,2010,40(6):750-756.

[18] ZHAN Y, LI J, MA W, et al. Characterization of interactions between taspine derivate TPD7 and EGF receptor by cell membrane chromatography with zonal elution and frontal analysis[J]. Chromatographia,2016,79(23/24):1585-1592.

[19] YANG L, ZHU M, KAN Y, et al. Investigation of the binding characteristics between ligands and epidermal growth factor receptor by cell membrane chromatography [J]. J Mol Recognit,2018,31(6):e2701.

[20] HAN S L, HUANG J, WANG S C, et al. Screening epidermal growth factor receptor antagonists from Radix et Rhizoma Asari by two-dimensional liquid chromatography [J]. J Sep Sci,2014,37(13):1525-1532.

[21] YANG X X, CHANG R M, YUE Y, et al. Cardiac muscle/cell membrane chromatography-offline-liquid chromatography/mass spectrometry method to identify bioactive components from traditional Chinese medicines [J]. Anal Lett,2013,46(9):1317-1330.

[22] 岳宣峰,张延妮,张志琪,等. 心肌细胞膜固定相色谱研究中药川芎提取液与受体的作用[J]. 中国中药杂志,2005,30(2):129-133.

[23] 李明华. 心肌细胞膜与中药朱砂七水溶性成分作用的色谱法研究[D]. 西安:陕西师范大学,2008.

[24] LI C Q, HE L C. Establishment of the model of white blood cell membrane chromatography and screening of antagonizing TLR4 receptor component from *Atractylodes macrocephala* Koidz [J]. Sci Chin Ser C: Life Sci,2006,49(2):182-189.

[25] LI C Q, HE L C, DONG H Y, et al. Screening for the anti-inflammatory activity of fractions and compounds from *Atractylodes macrocephala* Koidz [J]. J Ethnopharmacol,2007,114(2):212-217.

[26] YUE Y, XUE H, LI X, et al. High-expression β_1 adrenergic receptor/cell membrane chromatography method based on a target receptor to screen active ingredients from traditional Chinese medicines[J]. J Sep Sci,2013,37(3):244-249.

[27] XUE H, CHENG Y, LI X, et al. Rutaecarpine and evodiamine selected as β_1 -AR inhibitor candidates using β_1 -AR/CMC-offline-UPLC/MS prevent cardiac ischemia-reperfusion injury via energy modulation[J]. J Pharm Biomed Anal,2015,115:307-314.

[28] YUE Y, DOU L, LI X, et al. Screening β_1 AR inhibitors by cell membrane chromatography and offline UPLC/MS method for protecting myocardial ischemia [J]. J Pharm Biomed Anal,2015,115:339-344.

[29] 樊宏伟,余黎,洪敏,等. 血小板细胞膜固相色谱法的建立及其对丹参效应物质的初步分析[J]. 中国药学杂志,2004,39(5):375-378.

[30] 樊宏伟,朱荃,洪敏,等. 血小板细胞膜固相色谱法在脉络宁注射液效应物质分析中的应用[J]. 中国药学杂志,2006,41(1):63-66.

[31] 闫玉梅. 血小板细胞膜色谱筛选模型的构建及 P2Y-(12) 受体的表达纯化研究 [D]. 西安:西北大学,2016.

[32] WANG J, HUANG Z, LI S, et al. Screening of anti-platelet aggregation agents from *Panax notoginseng* using human platelet extraction and HPLC-DAD-ESI-MS/MS

- [J]. J Sep Sci, 2008, 31(6/7): 1173-1180.
- [33] CHEN X, CAO Y, LYU D, et al. Comprehensive two-dimensional HepG2/cell membrane chromatography/monolithic column/time-of-flight mass spectrometry system for screening anti-tumor components from herbal medicines[J]. J Chromatogr A, 2012, 1242: 67-74.
- [34] JIA D, CHEN X, ZHU Z, et al. On-line comprehensive two-dimensional HepG2 cell membrane chromatographic analysis system for charactering anti-hepatoma components from rat serum after oral administration of *Radix Scutellariae*; a strategy for rapid screening active compounds *in vivo* [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 118: 27-33.
- [35] DING X, CAO Y, CHAI Y, et al. Development of APTES-decorated HepG2 cancer stem cell membrane chromatography for screening active components from *Salvia miltiorrhiza* [J]. Anal Chem, 2016, 88(24): 12081-12089.
- [36] HOU X, WANG S, ZHANG T, et al. Recent advances in cell membrane chromatography for traditional Chinese medicines analysis [J]. J Pharmaceut Biomed, 2014, 101: 141-150.
- [37] WEI F, WANG S, XIE X, et al. Characterization the affinity of α_{1A} adrenoreceptor by cell membrane chromatography with frontal analysis and stoichiometric displacement model [J]. J Chromatogr B, 2017, 1040: 273-281.
- [38] SUN M, MA W, HE L, et al. Simultaneous screening of four epidermal growth factor receptor antagonists from *Curcuma longavia* cell membrane chromatography online coupled with HPLC-MS [J]. J Sep Sci, 2013, 36(13): 2096-2103.
- [39] GUO Y, HAN S, CAO J J, et al. Histamine H₁ receptor cell membrane chromatography online high-performance liquid chromatography with mass spectrometry method reveals houttuyfonate as an activator of the histamine H₁ receptor [J]. J Sep Sci, 2014, 37(21): 3188-3194.
- [40] WU X, CHEN X, JIA D, et al. Characterization of anti-leukemia components from *Indigo naturalis* using comprehensive two-dimensional K562 /cell membrane chromatography and *in silico* target identification [J]. Sci Rep, 2016, 6: 25491.
- [41] WEI F, HU Q, HUANG J, et al. Screening active compounds from *Corydalis yanhusuo* by combining high expression VEGF receptor HEK293 cell membrane chromatography with HPLC-ESI-IT-TOF/MSⁿ method [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 136: 134-139.
- [42] HAN S, LI C, HUANG J, et al. Cell membrane chromatography coupled with UHPLC-ESI-MS/MS method to screen target components from *Peucedanum praeruptorum* Dunn acting on α 1A adrenergic receptor [J]. J Chromatogr B, 2016, 1011: 158-162.
- [43] LIU J, YANG J, WANG S, et al. Combining human periodontal ligament cell membrane chromatography with online HPLC/MS for screening osteoplastic active compounds from *Coptidis Rhizoma* [J]. J Chromatogr B, 2012, 904: 115-120.
- [44] Stoll D R, LI X P, WANG X L, et al. Fast comprehensive two-dimensional liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 2007, 1168(1/2): 3-43.
- [45] LI W, NIU X, ZHOU P, et al. A combined peritoneal macrophage/cell membrane chromatography and offline GC-MS method for screening anti-inflammatory components from Chinese traditional medicine *Houttuynia cordata* Thunb [J]. Chromatographia, 2011, 73(7/8): 673-680.
- [46] LI M, WANG S, HE L. Development of an analytical method coupling cell membrane chromatography with gas chromatography-mass spectrometry via microextraction by packed sorbent and its application in the screening of volatile active compounds in natural products [J]. J Chromatogr B, 2015, 974: 9-16.
- [47] LI W F, NIU X F, HE L C, et al. A combined peritoneal macrophage/cell membrane chromatography and offline GC-MS method for screening anti-inflammatory components from Chinese traditional medicine *Houttuynia cordata* Thunb [J]. Chromatographia, 2011, 73(7/8): 673-680.
- [48] ZHANG Y, LIU F, WU Q, et al. Recognition and identification of active components from *Radix Bupleuri* using human neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. Biomed Chromatogr, 2016, 30(3): 440-446.
- [49] LIANG M J, HE L C, YANG G D, et al. Screening, analysis and *in vitro* vasodilatation of effective components from *Ligusticum chuanxiong* [J]. Life Sci, 2005, 78(2): 128-133.
- [50] 张宇, 李婷, 杨健, 等. 白芷中有效成分的筛选、分析及对大鼠血管活性的影响 [J]. 西北药学杂志, 2015, 30(1): 37-42.
- [51] GUO Y, HAN S, CAO J J, et al. Histamine H₁ receptor cell membrane chromatography online high-performance liquid chromatography with mass spectrometry method reveals houttuyfonate as an activator of the histamine H₁ receptor [J]. J Sep Sci, 2014, 37(21): 3188-3194.
- [52] 郑华珠, 王利胜, 吴银爱, 等. UPLC-MS/MS 联合细胞膜固相色谱法分析补阳还五汤作用于神经元样 PC12

细胞的效应成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(4): 14-20.

[53] LI M,WANG S C,ZHANG Y,et al. An online coupled cell membrane chromatography with LC/MS method forscreening compounds from *Aconitum carmichaeli* Debx. acting on VEGFR-2[J]. J Pharm Biomed Anal, 2010,53:1063-1069.

[54] XIAO J H, ZHANG H. An *Escherichia coli* cell membrane chromatography-offline LC-TOF-MS method for screening and identifying antimicrobial peptides from *Jatropha curcas* Meal protein isolate hydrolysates [J]. J Biomol Screen,2012,17(6):752-760.

[55] REN J, DAI D, DU H, et al. Prostate cell membrane chromatography-LC/MS method for screening α_{1A} -adrenoceptor antagonists from Lotus Plumule [J]. Chromatographia,2011,74(5/6):375-381.

[56] HE J,HAN S, YANG F, et al. Prostate cell membrane chromatography-liquid chromatography-mass spectrometry for screening of active constituents from *Uncaria rhynchophylla* [J]. J Chromatogr Sci, 2013, 51(10):905-909.

[57] SUN M, REN J, HE L, et al. A combined A431 cell membrane chromatography and online high performance liquid chromatography/mass spectrometry method for screening compounds from total alkaloid of Radix Caulophylli acting on the human EGFR [J]. J Chromatogr B,2010,878(28):2712-2718.

[58] WANG L, REN J, WANG S, et al. A combined cell membrane chromatography and online HPLC/MS method for screening compounds from Radix Caulophylli acting on the human α 1A-adrenoceptor [J]. J Pharm Biomed Anal,2010,51(5):1032-1036.

[59] YUE Y, XUE H, LI X, et al. High-expression β_1 adrenergic receptor/cell membrane chromatography method based on a target receptor to screen active ingredients from traditional Chinese medicines[J]. J Sep Sci,2013,37(3):244-249.

[60] LI WF, XING W, WANG S, et al. An online coupled peritoneal macrophage/cell membrane chromatography and highperformance liquid chromatography/mass spectrometry method to screen for anti-inflammatory components from the Chinese traditional medicine *Chloranthus multistachys* Pei [J]. Biomed Chromatogr, 2013,27(11):1580-1586.

[61] HAN S L,ZHANG T, HUANG J, et al. New method of screening allergenic components from Shuanghuanglian injection;With RBL-2H3/CMC model online HPLC/MS system[J]. J Pharm Biomed Anal,2014,88:602-608.

[62] LIU J, YANG J, WANG S C, et al. Combining human periodontal ligament cell membrane chromatography with online HPLC/MS for screening osteoplastic active compounds from Coptidis Rhizoma[J]. J Chromatogr B, 2012,904:115-120.

[责任编辑 顾雪竹]