

## · 综述 ·

## 细胞膜色谱技术在中药活性成分筛选中的应用进展

陈媛媛<sup>1</sup>, 郭 姣<sup>1,2\*</sup>

1. 广东药学院中医药研究院, 国家中医药管理局“高脂血症调肝降脂”重点研究室, 国家中医药管理局脂代谢实验室(三级), 广东省代谢性疾病中医药防治重点实验室, 广东 广州 510006
2. 广州中医药大学, 广东 广州 510006

**摘要:** 采用细胞作为筛选模型的生物色谱技术, 即细胞膜色谱技术, 将活性筛选、检测与化合物的分析鉴定进行集成, 已逐渐成为中药药效物质基础研究的重要手段。概述了细胞膜色谱技术的原理和特点, 综述了以4种常用细胞(血管细胞、肝细胞、红细胞、血小板)为筛选模型在中药活性成分筛选中的应用现状, 并探讨了细胞膜色谱技术的应用特点和存在问题。

**关键词:** 细胞膜色谱技术; 细胞; 中药; 活性成分; 筛选

**中图分类号:** R285.51      **文献标志码:** A      **文章编号:** 0253-2670(2012)02-0383-05

## Advances in application of cell membrane chromatography in screening bioactive components of Chinese materia medica

CHEN Yuan-yuan<sup>1</sup>, GUO Jiao<sup>1,2</sup>

1. Key Unit of Modulating Liver to Treat Hyperlipemia SATCM, Level 3 Laboratory of Lipid Metabolism SATCM, Guangdong TCM Key Laboratory for Metabolic Diseases, Institute of Chinese Medicinal Sciences, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China
2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

**Key words:** cell membrane chromatography (CMC); cell; Chinese materia medica (CMM); bioactive components; screening

中药药效物质基础研究作为中药研究的重要方向, 是中药现代化亟待突破的瓶颈问题, 需要探索新颖、可靠的方法。因此, 色谱、质谱技术与生物医学相结合的生物色谱技术应运而生。该类技术具有色谱高效分离分析的优势和以生物活性靶标进行特异筛选的特点, 筛选的药物能够直接与生物靶标进行亲和、吸附、瞄准<sup>[1-2]</sup>, 可以有效地消除无活性成分对筛选的干扰。细胞由于含有受体、离子通道、酶等效应靶点, 在选择筛选模型上得到广泛应用。现代药理研究表明<sup>[3]</sup>, 中药发挥作用的一个重要步骤是活性成分与靶细胞膜、细胞内特异性酶或受体结合。几乎所有具有药理活性的物质都易与细胞膜亲和或进入细胞中, 因此化合物的活性与其细胞膜亲和性和通透性密切相关。采用细胞作为筛选工具

的生物色谱技术, 即细胞膜色谱技术, 成为近年探寻中药物质基础研究的热点。

现代细胞生物学发现, 细胞膜上存在多种受体, 一般单个细胞的受体密度可达 $10^3 \sim 10^4$ 数量级, 是多靶标的理想材料<sup>[4]</sup>。不同种类细胞膜上具有不同种类受体、离子通道、酶等效应靶点。因此, 在应用细胞膜色谱技术筛选中药活性成分时, 需针对不同药理效应指标选择特定的体外细胞作为筛选工具, 如研究保肝活性成分, 可选择肝细胞进行筛选分析; 研究血管舒张活性成分, 可选用血管内皮细胞进行筛选分析; 研究免疫调节活性成分, 可选择淋巴细胞或造血细胞进行筛选分析等。本文将从细胞的角度综述细胞膜色谱技术在中药活性成分筛选主要领域中的应用进展。

收稿日期: 2011-09-26

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目(2009B090300349); 广东省自然科学基金团队项目(10351022401000000); 广州市科技计划项目(2009Z1-E361)

作者简介: 陈媛媛(1986—), 女, 在读硕士研究生, 从事中药及复方化学成分研究。Tel: (020)39352607 Fax: (020)39352606 E-mail: cyy.0597@163.com

\*通讯作者 郭 姣 Tel: (020)39352607 Fax: (020)39352606 E-mail: gyguoyz@163.com

## 1 细胞膜色谱技术的分类及原理

根据所选的细胞膜是否固定于色谱载体上可将细胞膜色谱技术分为细胞膜生物亲和色谱技术与细胞膜固相色谱技术<sup>[5]</sup>。

### 1.1 细胞膜生物亲和色谱技术

细胞膜生物亲和色谱技术是将人或动物的活性组织细胞膜固定在特定载体表面, 制备成细胞膜固定相, 用色谱分析的方法研究药物或化合物与固定相上细胞膜及膜上受体的相互作用。该方法的原理见图 1, 复杂的中药体系通过以细胞膜为固定相的色谱柱时, 与细胞膜发生亲和、吸附、锚定等作用, 从而根据中药成分在细胞膜色谱柱上亲和程度的差异进行活性成分的筛选。主要流程包括: (1) 分离活性细胞膜; (2) 固定化活性细胞膜; (3) 制备细胞膜色谱柱; (4) 细胞膜色谱分离、分析<sup>[4]</sup>。该方法最大特点是具有色谱分离和细胞膜活性双重特性<sup>[6]</sup>, 色谱参数与药物最终的药理作用密切相关; 筛选方法快速、简捷、命中率高; 靶点多样, 适合于中药这一复杂体系的研究。

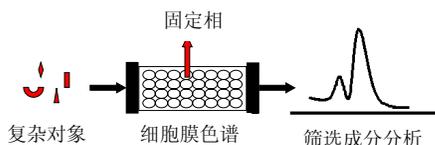


图 1 细胞膜生物亲和色谱法的原理示意图  
Fig. 1 Diagram of cell membrane bio-affinity chromatography

### 1.2 细胞膜固相色谱技术

细胞膜固相色谱法是直接以活性细胞为分离载体, 以中药提取物为研究对象, 依据提取物中的成分与细胞是否具有特异亲和能力而进行分离。该方法的原理见图 2, 采用色谱技术比较中药提取物与细胞结合前后中药提取物色谱图的变化, 分析细胞破碎液中与活性细胞相结合的成分, 应用在线 LC-MS 等技术进行鉴定, 从复杂的中药体系中筛选出与活性细胞相互作用的成分<sup>[3]</sup>。主要流程包括: (1) 细胞与药物亲和孵育; (2) 未亲和成分洗脱; (3) 亲和成分提取; (4) 色谱分离、分析、比较。该方法最大特点是应用活性细胞为固定相, 选择性地结合中药提取物中的活性成分, 细胞膜的完整性、膜受体的立体结构、周围环境和靶点得以保持; 操作简便易行。

## 2 细胞膜色谱技术的应用

近年来, 各种细胞膜<sup>[5]</sup>和活体细胞<sup>[3]</sup>均被用于

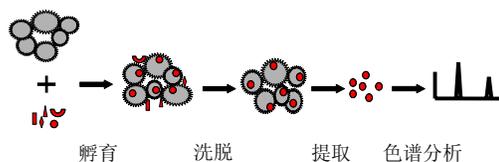


图 2 细胞膜固相色谱法的原理示意图

Fig. 2 Diagram of cell membrane solid chromatography

中药活性成分的筛选, 以下对常用于细胞膜色谱法筛选中药活性成分的细胞进行简要介绍。

### 2.1 血管内皮细胞

血管内皮细胞是一层连续覆盖于整个血管腔表面的扁平细胞, 是血管基底膜的重要组成部分, 其结构和功能的紊乱与多种疾病尤其是心脑血管疾病、辐射损伤、糖尿病及肿瘤转移等重大疾病的病理机制密切相关, 内皮细胞功能的研究日益受到重视<sup>[7]</sup>。功效与血管内皮细胞相关的中药有: 活血化瘀药、补益药、平肝潜阳药、益肾活血药、清热解毒药等, 如丹参、三七、蒲黄、川芎、葛根、黄芩、黄芪、人参等<sup>[8]</sup>。

目前血管内皮细胞在细胞膜色谱技术中的主要应用有: (1) 血管舒张活性成分的筛选。Liang 等<sup>[9]</sup>采用大鼠动脉细胞膜固相色谱筛选中药川芎中对血管有舒张作用的活性成分, 结果表明藁本内酯和丁烯基苯酚有着与维拉帕米相似的色谱保留行为。结合离体药理实验证明以上两种物质能显著抑制去甲肾上腺素及氯化钙引起的血管收缩。(2) 保护血管内皮细胞免受损伤的活性成分的筛选。Su 等<sup>[10]</sup>采用细胞膜固相色谱法, 以脐静脉内皮细胞为靶细胞, 应用该技术对少腹逐瘀汤的活性组分 SF-11 进行了研究, 结果显示 SF-11 中芍药苷和香蒲新苷与内皮细胞具有特异性的相互作用。经药理实验证明这两个成分能明显抑制内皮素 (ET) 释放和 NO 分泌, 并促进前列环素 (PGI<sub>2</sub>) 释放。(3) 抑制血管新生活性成分的筛选。李义平等<sup>[11]</sup>用体外培养的 ECV304 细胞, 以硅胶为载体制备 ECV304 细胞膜固定相, 应用血管内皮细胞膜亲和色谱模型筛选红毛七中的活性成分, 并通过血管内皮细胞管腔形成实验进行初步药理学验证。

目前, 血管内皮细胞作为筛选工具主要集中于血管舒张及抑制血管生成活性成分的筛选。值得注意的是, 多数的研究是以正常人或动物细胞株为筛选工具, 个别研究采用病理、病证细胞为筛选工具, 如林蓉等<sup>[12]</sup>采用 CD40 高表达细胞膜色谱模型筛选

抗动脉粥样硬化中药活性成分, CD40-CD40L 是动脉粥样硬化疾病相关基因, 阻断 CD40-CD40L 炎症信号通路为抗动脉粥样硬化药物作用靶点。因此建立病理、病证细胞模型进行筛选, 增强了该技术应用的特异性。

## 2.2 肝细胞

肝脏是动物在正常生理和病理状态下进行能量代谢、毒素的生物转化以及血浆蛋白合成的中心器官<sup>[13]</sup>。肝细胞是肝脏最主要的实质细胞类型, 具有丰富的酶系及多种特异性功能, 可在细胞水平上提供吸收、代谢、转运等综合信息<sup>[14]</sup>。肝细胞模型是药效筛选、毒性筛选、药物代谢与生物转化、药物相互作用、药物致癌性检测的理想模型<sup>[15]</sup>, 主要应用于活血化瘀、清热利湿、补益肝肾、疏肝健脾、补肾益气、阴阳平补等中药及复方的研究。涉及肝细胞结构和功能异常的疾病有: 酒精性肝病、高脂血症、肝纤维化、肿瘤以及心血管疾病等。目前, 肝细胞在细胞膜色谱中的应用实例并不多见, 主要是一些保肝活性成分的筛选。

Zhang 等<sup>[16]</sup>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 个可能具有活性的成分。洪敏等<sup>[17]</sup>采用肝细胞固相色谱-HPLC 法分析栀子中保肝作用的活性成分, 筛选出 2 个主要保肝效应成分, 其中 1 个为栀子苷, 另 1 个为未知成分; 而栀子苷已被验证是栀子的主要有效成分, 对多种肝损伤具有良好的保护作用。

以肝细胞作为筛选模型的细胞膜色谱法目前主要采用细胞膜固相色谱法的形式进行筛选, 而并未见到以细胞膜生物亲和色谱法形式的应用; 而且, 肝细胞筛选研究并未进一步采用药理实验对其活性进行验证, 因此, 应将药效评价与活性成分筛选结合起来, 以验证方法的特异性与可行性。

## 2.3 红细胞

红细胞是血液中数量最多的一种血细胞。红细胞不仅具有携带氧、二氧化碳、运输能量的能力, 还与机体的免疫调控、炎症、代谢、运动等功能有着密切的关系。与其相关的病理病变主要有: 贫血、红细胞增多症、类风湿关节炎、糖尿病等<sup>[18]</sup>。功效与红细胞相关的中药主要是清肝化瘀药、益气补肾药、活血降浊药、补气药、补血药、活血祛瘀药等研究较多。

近年来, 基于红细胞膜的细胞膜色谱已经成功

应用于当归、金刷把等中药的活性成分筛选。Dong 等<sup>[19]</sup>采用红细胞固相色谱技术筛选当归提取液的有效成分——洋川芎内酯等化合物, 经细胞药理学研究证实其具有提高红细胞变形能力及降低红细胞聚集的作用。张博等<sup>[20]</sup>用兔红细胞膜色谱模型对金刷把进行筛选, 以 MTT 比色法测定其细胞毒活性, 结果表明金刷把乙醚萃取部位是具有细胞毒活性的有效部位。红细胞的变形能力及聚集作用是许多疾病需要考察的指标, 通过红细胞膜色谱法筛选出与红细胞相互作用的活性成分, 可为多种中药的物质基础研究提供参考。

## 2.4 血小板

血小板是哺乳动物血液中的有形成分之一<sup>[21]</sup>。至今已发现 40 余种血小板膜受体, 它们与相应配体结合后在止血和血栓形成、凝血、纤溶、炎症、伤口愈合及免疫调节中发挥着重要作用<sup>[22]</sup>。

目前临床上主要使用的抗血小板药物的作用机制均与血小板膜上的受体、酶等直接相关。因此以血小板作为工具筛选抗血小板活性成分为目标最清晰的模型。在中药筛选的应用中, 以血小板为模型的细胞膜固相色谱法也已成功应用于多种中药及复方中活性成分的筛选, 如三七<sup>[23-24]</sup>、丹参<sup>[25]</sup>、红花<sup>[26]</sup>、脉络宁注射液<sup>[27]</sup>等。Wang 等<sup>[23]</sup>采用血小板固相色谱技术筛选三七中抗血小板聚集活性成分, 从中筛选出 5 个与血小板有相互作用的成分, 采用 HPLC-DAD-ESI-MS/MS 分析鉴定了其中 4 个成分; 并结合体外药理实验验证 4 个成分的抗血小板聚集活性。说明化合物在细胞膜色谱体系中的保留特征与其药理作用有显著的相关性。樊宏伟等<sup>[25]</sup>采用血小板细胞膜固相色谱技术分析丹参抗血小板聚集的活性成分; 并采用同法初步确定了脉络宁注射液中 8 个具有抗血小板聚集作用的活性成分, 认为该技术基本可以反映化合物与细胞膜生物靶点的相互作用<sup>[27]</sup>。

## 2.5 其他

细胞膜色谱技术一般性的筛选思路是根据所筛选中药的不同功效, 选择相应的细胞工具进行筛选, 如 Wang 等<sup>[28]</sup>以大鼠心肌细胞膜亲和色谱模型研究类叶牡丹的抗心肌缺血活性成分, 筛选出 1 种新的茆酮类生物碱——caulophine。药理研究表明<sup>[29]</sup>, caulophine 作为钙拮抗剂, 能够保护咖啡因所致的心肌损伤, 从而表明 caulophine 在心肌细胞膜色谱体系中的保留特性与其药理作用有显著相关性。也

有的思路是根据中药作用多靶点、多途径起效的需求选择多种细胞加以筛选,筛选出与不同靶细胞有结合的成分。Zhang等<sup>[16]</sup>以肝细胞(HL-7702)、巨噬细胞(RAW 264.7)、肠系膜细胞(Caco-2)为筛选细胞,采用HPLC分析,筛选当归补血汤中的活性成分,共筛选出9种与HL-7702细胞,7种与RAW 264.7细胞,13种与Caco-2细胞相结合的活性成分。

### 3 细胞膜色谱技术在中药活性筛选中的应用特色

目前,细胞膜色谱技术仍是非常新颖、有效的中药活性成分筛选技术,其以现代分子药理学为依据,以色谱、质谱为技术支持,特异性识别与细胞发生亲和、吸附、锚定的活性成分,巧妙地将两个复杂体系(中药体系、生物体系)客观地联系起来。该技术的应用具有以下特点。

#### 3.1 特异性

可以从细胞学角度直接观察药物对细胞的作用,可以避免体内研究中药物代谢反应、种间及个体间的耐药性差异等复杂过程,排除杂质成分的干扰,特异性、选择性地筛选中药及复方的活性成分。

#### 3.2 多靶标性

细胞膜上具有丰富的受体,所以选用细胞作为筛选工具可以避免单一、高选择性靶标筛选效率低、作用单一、使用成本高等缺点,是多靶标筛选的理想材料,更适合于中药这一复杂体系的研究。

#### 3.3 结合性

这种方法使活性成分的分离和筛选结合在一起,克服了以往先从中药中分离有效部位或单体,再分析其药效的这种成分分离和药效筛选脱节的弊端。

#### 3.4 适用性

由于细胞的生长条件和来源较实验动物更经济方便,故细胞水平的筛选模型可以应用到各种人类疾病的研究和治疗药物的筛选中,并且更加适合进行大规模药物筛选。

### 4 细胞膜色谱技术应用于中药活性成分筛选存在的问题

细胞膜色谱技术为中药活性成分的筛选提供了一种思路和手段,具有良好的发展前景。但在中药活性成分筛选应用过程中仍存在一些有待解决的问题。

#### 4.1 细胞膜色谱技术还只是体外活性成分筛选手段

细胞膜色谱技术尚不能完全模拟体内复杂环境,机体内其他系统对活性成分发挥药效作用的影

响也无法考察<sup>[5]</sup>。因此在应用时可以考虑使用中药入血成分或体内代谢物作为研究对象来提高筛选对象的模拟程度,通过建立在病理细胞或病证细胞模型上的筛选来提高生物的模拟程度,从而提高该技术应用的特异性和准确度。

#### 4.2 细胞膜色谱技术的应用是建立在受体学说的基础之上

其可行性存在两个问题:一是“漏没漏”的问题,活性成分还可能通过改变细胞外离子浓度、pH值环境或与细胞外成分作用等机制发挥药效。因此,该技术只能用于筛选具有明确靶点作用的中药活性成分;而且,单用一种细胞筛选也存在指标单一的问题;二是“是不是”的问题,细胞往往发挥多种生理功能,筛选出的成分到底是作用于哪种功能难以说清,应当选用功能单一的细胞才能提高其特异性。

#### 4.3 需要进一步的药理评价验证

虽然利用具体细胞工具可以不同程度地表现出被筛选成分的药理活性,但是不能解释被筛选成分的作用机制和作用强度,不能说明是对受体的激动作用或是拮抗作用。因此,后续合理的、充分的药理评价实验是非常必要的,也是回答所筛选的成分“是不是”活性成分的主要依据。

#### 参考文献

- [1] 邱红鑫,黄庆德,陈丹,等.生物色谱法在中药研究中的应用进展[J].中华中医药学刊,2010,28(1):144-147.
- [2] 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.
- [3] 吴茜,毕志明,李萍,等.基于整体观的中药药效物质基础的生物活性筛选/化学在线分析研究新进展[J].中国药科大学学报,2007,38(4):289-293.
- [4] 李绍平,赵静,钱正明,等.色谱技术在中药有效成分辨识中的应用进展[J].中国科学:化学,2010,40(6):651-667.
- [5] 方艺霖,张艺,肖小河,等.细胞膜色谱技术用于中药活性成分筛选的研究进展[J].中草药,2008,39(7):1119-1121.
- [6] He L C, Wang S C, Yang G D, et al. Progress in cell membrane chromatography[J]. Drug Discov Ther, 2007, 1(2): 104-107.
- [7] 张辉,谭小进.血管内皮细胞的功能与支架置入后血管内皮化的关系[J].社区医学杂志,2010,8(9):48-51.
- [8] 管昌益,肖子杰.对血管内皮细胞有保护作用的中药筛选[J].中医药通报,2002,1(1):51-54.
- [9] 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.
- [10] Su S L, Yu L, Hua Y Q, *et al.* Screening and analyzing the potential bioactive components from Shaofu Zhuyu Decoction, using human umbilical vein endothelial cell extraction and high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2008, 22(12): 1385-1392.
- [11] 李义平, 贺浪冲. 血管内皮细胞膜色谱模型的建立及初步应用 [J]. 科学通报, 2007, 52(4): 410-415.
- [12] 林 蓉, 杨广德, 王维蓉, 等. 用 CD40 高表达细胞膜色谱模型筛选丹参中抗动脉粥样硬化的活性成分 [J]. 中药材, 2006, 29(12): 1315-1317.
- [13] 田三德, 潘 婕, 解尚云. 体外肝细胞培养的研究进展 [J]. 陕西科技大学学报, 2006, 24(5): 152-155.
- [14] 陈慧梅, 廖 红, 高 静. 肝细胞培养方法研究进展 [J]. 细胞生物学杂志, 2002, 24(3): 163-166.
- [15] 罗 丹, 刘华钢. 原代肝细胞的分离培养及其在药物研发中的应用 [J]. 广西科学, 2006, 13(4): 334-337.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 张之南, 李蓉生. 红细胞疾病基础与临床 [M]. 北京, 科学出版社, 2000.
- [19] Dong Z B, Li S P, Hong M, *et al.* Hypothesis of potential active components in *Angelica sinensis* by using biomembrane extraction and high performance liquid chromatography [J]. *Analysis*, 2005, 38: 664.
- [20] 张 博, 贺浪冲. 用细胞膜色谱法分析金刷把中具有细胞毒活性的有效成分 [J]. 现代医药卫生, 2006, 22(15): 2303-2304.
- [21] 史秀丽, 傅 佳, 李光武. 血小板靶向中药有效成分及单体研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(5): 361-365.
- [22] 唐雪元. 血小板膜受体多态性与血栓性疾病 [J]. 国外医学: 输血及血液学分册, 2000, 23(5): 320-323.
- [23] Wang J, Huang Z G, Cao H, *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.
- [24] 黄赵刚. 血小板生物亲和萃取结合 HPLC 法筛选三七抗血小板聚集活性皂苷成分 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2005.
- [25] 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]. 中国药理学杂志, 2004, 39(5): 375-379.
- [26] 贾 俊. 红花注射抗血栓药物质基础初步研究 [D]. 太原: 山西大学, 2010.
- [27] 樊宏伟, 余 黎, 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]. 中国药理学杂志, 2004, 41(1): 63-65.
- [28] Wang S, B. Fluorenone alkaloid from *Caulophyllum robustum* Maxim. with anti-myocardial ischemia activity [J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(4): 521-526.
- [29] Si K W, Liu J T, He L C, *et al.* Effects of caulophine on caffeine-induced cellular injury and calcium homeostasis in rat cardiomyocytes [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2010, 107(6): 976-981.