

## 基于细胞膜色谱技术的人参皂苷及五味子木脂素与血管内皮生长因子受体的作用分析

许晴<sup>1,3</sup>, 李智<sup>2,3</sup>, 万梅绪<sup>2,3</sup>, 张燕欣<sup>2,3</sup>, 李德坤<sup>2,3\*</sup>, 鞠爱春<sup>2,3\*</sup>

1. 河北中医学院 药学院, 河北 石家庄 050091

2. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410

3. 天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室, 天津 300410

**摘要:** 目的 运用细胞膜色谱(CMC)技术检测分析人参皂苷与五味子木脂素中15种成分与血管内皮生长因子(VEGF)受体的作用。方法 运用Western blotting法检测筛选VEGF受体高表达细胞株;构建VEGF受体CMC,并建立ECV304/CMC online-LC检测方法,以索拉菲尼作为阳性药,对人参皂苷Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub>、Rc、Rd、Rg<sub>1</sub>、Rg<sub>2</sub>、Rg<sub>3</sub>、Rh<sub>1</sub>、Ro、F<sub>2</sub>,五味子甲素,五味子乙素,五味子醇甲,五味子醇乙进行VEGF受体结合强度的检测分析;CCK-8法检测筛选出的成分(5、10 μg/mL)对ECV304细胞的促增殖作用。结果 Western blotting结果显示,ECV304细胞中VEGF受体高表达;人参皂苷Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub>、Rc、Rd、Rg<sub>3</sub>、Rh<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、五味子甲素、五味子乙素与VEGF受体CMC柱有结合作用;CCK-8法检测以上成分对ECV304细胞的活力影响发现,人参皂苷Rb<sub>2</sub>能促进细胞的增殖。结论 人参皂苷Rb<sub>2</sub>能与VEGF受体结合,且显著促进ECV304细胞增殖。

**关键词:** 细胞膜色谱技术; 人参皂苷Rb<sub>2</sub>; 血管新生; 活性成分; 人参皂苷; 五味子甲素; 五味子乙素; 五味子醇甲; 五味子醇乙

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)11-2379-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.11.012

## Detection of effects of ginseng saponins and schisandra lignin on vascular endothelial growth factor receptor by cell membrane chromatography

XU Qing<sup>1,3</sup>, LI Zhi<sup>2,3</sup>, WAN Meixu<sup>2,3</sup>, ZHANG Yanxin<sup>2,3</sup>, LI Deikun<sup>2,3</sup>, JU Aichun<sup>2,3</sup>

1. College of Pharmacy, Hebei College of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China

2. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co.,Ltd., Tianjin 300410, China

3. Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation Enterprise of TCM Injections, Tianjin 300410, China

**Abstract: Objective** To detect and analyze the effect of 15 components from ginseng saponins and schisandra lignin on angiogenesis by cell membrane chromatography. **Methods** Western blotting detection was used to screen the cell lines with high expression of VEGF receptor. Cell membrane chromatographic column was prepared by ECV304 cell membrane and ECV304/CMC online-LC detection method was established. With sorafenib as a positive drug, the receptor binding strength of VEGF was detected and analyzed for ginsenosides Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rb<sub>3</sub>, Rc, Rd, Rg<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>, Rh<sub>1</sub>, Ro, F<sub>2</sub>, deoxyschizandrin, γ-schizandrin, schisandrol A, schisandrol B. CCK-8 assay was used to detect the proliferative effects of the selected ingredients (5 and 10 μg/mL) on ECV304 cells. **Results** Western blotting results showed that VEGF receptor was highly expressed in ECV304 cells. It was found that ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rb<sub>3</sub>, Rc, Rd, Rg<sub>3</sub>, Rh<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, schisandrin A and schisandrin B had binding effect. CCK-8 assay showed that ginsenoside Rb<sub>2</sub> could promote the proliferation of ECV304 cells. **Conclusion** Ginsenoside Rb<sub>2</sub> can bind to angiogenic VEGF receptor, and can significantly promote the proliferation of ECV304.

**Key words:** cell membrane chromatography; ginsenoside Rb<sub>2</sub>; angiogenesis; active ingredients; ginsenosides; deoxyschizandrin; γ-schizandrin; schisandrol A; schisandrol B

收稿日期: 2021-07-30

第一作者: 许晴,女,硕士,研究方向为中药生产与质量控制。E-mail: 1394114549@qq.com

\*共同通信作者: 李德坤,男,高级工程师,主要从事中药工艺、质量控制、中药药理及药物警戒研究。E-mail: lidekun@tasly.com

鞠爱春,男,正高级工程师,研究方向为中药注射剂工艺及质量控制。E-mail: juach@tasly.com

细胞膜色谱 (cell membrane chromatography, CMC) 是由西安交通大学贺浪冲教授于 1996 年研发出来的筛选活性成分的新技术, 该技术是一种研究药物与细胞膜上受体相互作用的亲和色谱技术, 既有生物活性又含色谱分离 2 种特性<sup>[1]</sup>, 对于复杂体系如天然药物或者复方中药中活性成分的筛选具有一定优势<sup>[2]</sup>。其原理是将活性组织中的细胞膜固定在特定载体上制备成细胞膜固定相, 来研究药物与膜受体之间的作用, 从而达到特异性识别的目的<sup>[3]</sup>, 而受体与配体结合的特定选择性, 保证了所筛成分的准确性。

血管生成是指从已存在的毛细血管网中通过“萌芽”或“分叉”等方式生长出新的毛细血管的过程<sup>[4]</sup>, 血管内皮生长因子 (VEGF) 主要对血管通透性和新血管生成 (新血管形成) 产生影响<sup>[5]</sup>, 它主要通过与其受体结合来调节内皮细胞的迁移与增殖, 对促进血管生成非常重要<sup>[6]</sup>。肿瘤及心血管疾病均与血管新生关系密切<sup>[7-8]</sup>, 而本实验以促进血管新生为目标, 构建 VEGF 受体 CMC, 研究人参皂苷及五味子木脂素中是否存在促血管新生的成分。

## 1 材料

### 1.1 细胞

ECV304 细胞, 购自于艾礼生物科技 (上海) 有限公司; HEK293 和 RBL-2H3 细胞, 均购自 ATCC 细胞库。

### 1.2 主要试剂

色谱硅胶 (购自于青岛美高集团有限公司); 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub>、Rc、Rd、Rg<sub>1</sub>、Rg<sub>2</sub>、Rg<sub>3</sub>、Rh<sub>1</sub>、Ro、F<sub>2</sub>, 五味子醇甲, 五味子醇乙, 五味子甲素, 五味子乙素 (批号分别为 HR151213S1、HR27160W5、HR2095W5、HS1811S12、HR7946W8、HG027162、19081304、HR27161W8、HR27165W2、HS19115B2、HR7745W8、HS6045S1、HS19911B1、HS19906B1、HR2104W7, 质量分数 > 98%, 均购自于宝鸡辰光生物技术有限公司); 索拉菲尼 (质量分数 > 98%, 购自于北京北纳创联生物技术研究); 环丙沙星 (质量分数 > 98%, 购自于中国食品药品检定研究院); 吉非替尼 (质量分数 > 98%, 购自于成都曼斯特生物科技有限公司); 色谱甲醇和乙腈 (购自于默克公司, 德国); 超纯水 (实验室制备); DMEM 高糖培养基 (购自于 Thermo Fisher 公司); 胎牛血清 (FBS, 购自于 HYCLONE 公司); 青霉素/链霉素、磷酸缓冲液 (PBS)、胰蛋白酶 (均购自于 Gibco 公司); 牛血清白蛋白 (购自于 Sigma 公司); 低渗溶液 (称取 0.61 g

Tris、0.37 g KCl 和 0.25 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 溶于 500 mL 超纯水中, 用 HCl 调 pH 至 7.4); 生理盐水 (购自于石家庄市第四药业有限公司); VEGF 受体 2 (VEGFR 2) 抗体 (购自于 Abcam 公司); GAPDH 抗体 (购自 Proteintech 公司)。

### 1.3 主要仪器

ST16R 台式离心机 (Thermo Fisher 公司 ST16R); KQ-250E 型超声波清洗器 (昆山市超声波仪器有限公司); Magnetic Stirrer (KEKT-A 公司); SHB-III 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); VORTEX-GENIE (Scientific Industries); 多功能酶标仪 (TECAN 公司); Waters CMC/HPLC 系统 [中谱智装 (海南) 技术有限公司]。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

一维色谱条件: 色谱柱为 VEGF 受体 CMC 柱, 流动相为超纯水, 紫外检测, 检测波长均为 203 nm, 柱温 37 °C, 体积流量为 0.2 mL/min, 进样量为 10 μL。

### 2.2 VEGF 受体蛋白的表达检测

VEGF 受体为血管新生的关键因素、标志物<sup>[9]</sup>, VEGFR2 活化诱导的信号作用于血管内皮细胞是血管生成的主要控制者<sup>[10]</sup>。且 ECV304 细胞中含有大量的 VEGF 受体, 因此运用 Western blotting 法检测 VEGFR2 表达。取对数生长期的 ECV304、HEK293 和 RBL-2H3 3 种细胞提取蛋白, 加入 RIPA 裂解液, 超声裂解, 4 °C、12 000×g 离心 15 min, 收集上清; 采用 Bradford 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 最终制备成蛋白质量浓度均为 1.75 μg/μL 的样品。蛋白样品经 8% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳, 转至 PVDF 膜, 于 5% 牛血清白蛋白中封闭 2 h, 加入 VEGFR2 抗体 (1:1 000) 4 °C 孵育过夜; 加入 HRP 标记的山羊抗兔抗体 (1:1 000), 室温孵育 2 h, 加入 ECL 发光液显影, 实验重复 3 次。内参蛋白为 GAPDH, Image J 软件分析蛋白表达量。

ECV304 细胞中 VEGFR2 蛋白的表达水平显著高于 HEK293 和 RBL-2H3 细胞, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。本实验选择高表达 VEGFR2 的 ECV304 细胞进行后续实验。见图 1。

### 2.3 细胞培养与 CMC 柱的制备

ECV304 细胞的培养: 将 VEGF 受体高表达细胞 ECV304 培养于完全培养基中 (含 10% FBS 和 1% 青霉素、链霉素混合物), 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育。VEGF 受体 CMC 柱的制备<sup>[11]</sup>: 收集长满的 ECV304 细胞, 低速低温离心, 于 4 °C 条件下用低渗

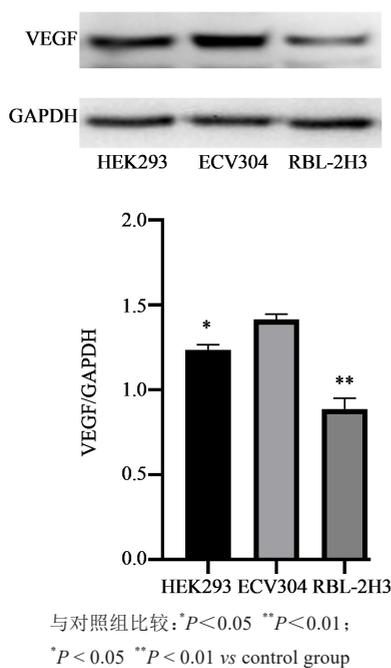


图1 VEGF受体在不同细胞中的表达水平

Fig. 1 Expression level of VEGF receptor in different cells

溶液重悬细胞沉淀,超声破碎细胞,得到细胞膜悬液,其与105℃活化后的硅胶在减压震荡的条件下混匀,并搅拌30 min,4℃冰箱过夜固化,第2天湿法装柱,制备得到VEGF受体CMC柱。

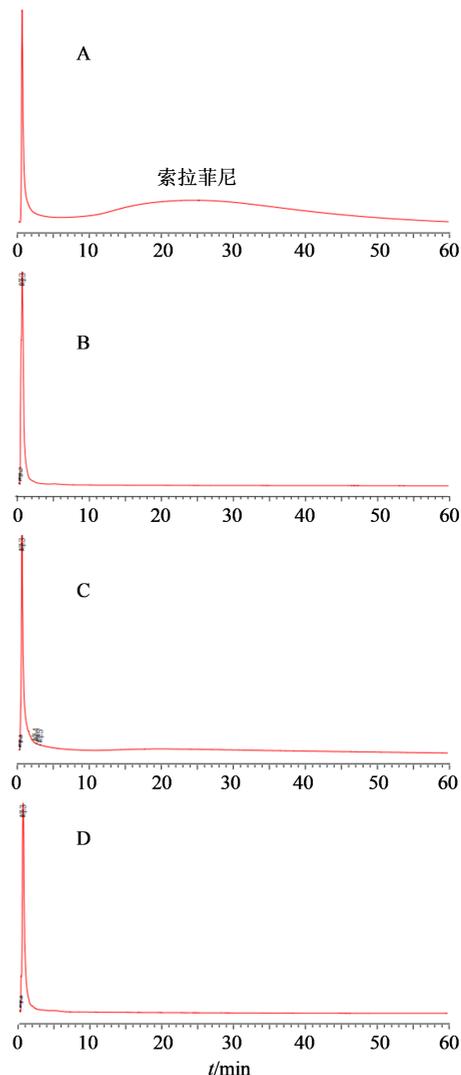
#### 2.4 VEGF受体CMC柱的特异性

选取特异性作用于VEGF受体的索拉菲尼(1 mg/mL)作为阳性对照药,以及作用于其他受体的环丙沙星(1 mg/mL)、吉非替尼(1 mg/mL)作为阴性对照药,考察VEGF受体CMC柱的特异性。与此同时用“2.3”项方法制备不含细胞膜空硅胶柱,应用索拉菲尼进样2根柱子,检测索拉菲尼对VEGF受体CMC柱的专属性。

结果如图2所示,索拉菲尼只能在VEGF受体CMC柱上结合且结合时间约为50 min,在空硅胶柱上无结合;2个阴性对照药在VEGF受体CMC柱上无结合。结果说明VEGF受体CMC柱的特异性强。

#### 2.5 样品结合检测

将人参皂苷Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub>、Rc、Rd、Rg<sub>1</sub>、Rg<sub>2</sub>、Rg<sub>3</sub>、Rh<sub>1</sub>、Ro、F<sub>2</sub>,五味子甲素,五味子乙素,五味子醇甲,五味子醇乙分别配制成1 mg/mL溶液并过0.45 μm滤膜,4℃保存。按照“2.1”项下实验条件进样至VEGF受体CMC中,分析时间为1 h,观察其保留行为,实验结果以结合时间为指标,0 min:无结合(-);0~5 min,微弱结合(+);5~10 min,弱结合(++);10~20 min,较强结合(+++);20 min以上,强结合(++++)。



A、C、D-索拉菲尼、环丙沙星和吉非替尼进样VEGF受体CMC柱;B-索拉菲尼进样空硅胶柱

A, C, D-VEGF receptor cell membrane chromatographic column of sorafenib, ciprofloxacin and gefitinib respectively; B-empty silica gel column of sorafenib

图2 VEGF受体CMC柱的特异性考察

Fig. 2 Specificity of VEGF receptor cell membrane chromatographic column

如表1所示,人参皂苷Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub>、Rc、Rd、Rg<sub>3</sub>、Rh<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、五味子甲素、五味子乙素能与VEGF受体结合,推测这些成分可能具有促血管新生作用。

#### 2.6 细胞增殖实验

取对数生长期的ECV304细胞PBS清洗、胰酶消化,制备成浓度为2×10<sup>5</sup>/mL的细胞悬液,接种于96孔板中,孵育24 h后加入分别加入人参皂苷Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub>、Rc、Rd、Rg<sub>3</sub>、Rh<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>,五味子甲素,五味子乙素(5、10 μg/mL),每个浓度设置6个复孔,以不加药为对照组,以DMSO(5 μg/mL)为溶剂对照组,并以

表1 与 ECV304CMC 柱相结合的活性成分

Table 1 active components combined with ECV304 cell membrane chromatographic column

组别	结合强度	结合时间/min	组别	结合强度	结合时间/min
人参皂苷 Rb <sub>1</sub>	+++	12	人参皂苷 Rh <sub>1</sub>	++	10
人参皂苷 Rb <sub>2</sub>	+++	16	人参皂苷 Ro	—	—
人参皂苷 Rb <sub>3</sub>	+++	18	人参皂苷 F <sub>2</sub>	+++	16
人参皂苷 Rc	++	12	五味子甲素	++	8
人参皂苷 Rd	+++	18	五味子乙素	++++	55
人参皂苷 Rg <sub>1</sub>	—	—	五味子醇甲	—	—
人参皂苷 Rg <sub>2</sub>	—	—	五味子醇乙	—	—
人参皂苷 Rg <sub>3</sub>	++++	24			

无血清培养基作为空白对照。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h 后加 10% CCK-8 混匀, 37 °C 孵育 40 min。酶联免疫检测仪于 450 nm 处测定各孔吸光度(A)值。

$$\text{细胞相对增殖率} = (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

细胞增殖实验初步筛选结果表明人参皂苷 Rb<sub>2</sub> 和五味子乙素对 ECV304 细胞增殖可能有促进作用, 见表 2。

表2 各组细胞增殖率(n=6)

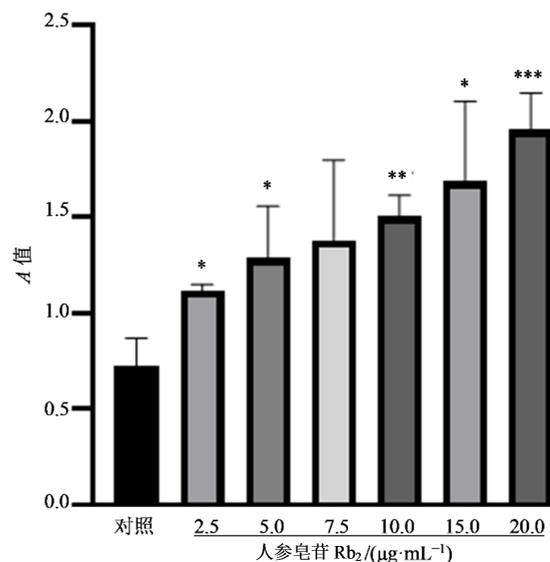
Table 2 Proliferation rate of each group (n=6)

组别	浓度/ (μg·mL <sup>-1</sup> )	相对增 殖率/%	组别	浓度/ (μg·mL <sup>-1</sup> )	相对增 殖率/%
对照	—	100.0	人参皂苷	5	49.3
DMSO	5	24.2	Rg <sub>3</sub>	10	38.4
人参皂苷	5	50.0	人参皂苷	5	83.0
Rb <sub>1</sub>	10	56.6	Rh <sub>1</sub>	10	81.8
人参皂苷	5	101.4	人参皂苷	5	74.6
Rb <sub>2</sub>	10	94.5	F <sub>2</sub>	10	60.4
人参皂苷	5	95.5	五味子甲	5	23.6
Rb <sub>3</sub>	10	89.9	素	10	49.4
人参皂苷	5	61.6	五味子乙	5	155.3
Rc	10	80.0	素	10	142.0
人参皂苷	5	34.0			
Rd	10	85.1			

实验过程中发现, 五味子乙素也与空硅胶柱结合, 选择人参皂苷 Rb<sub>2</sub> 进一步设置 6 个浓度梯度(2.5、5.0、7.5、10.0、15.0、20.0 μg/mL) 进行验证, 人参皂苷 Rb<sub>2</sub> 能明显促进 ECV304 细胞增殖, 与对照组比较, 差异有统计学意义(P<0.05), 说明对血管新生有促进作用。见图 3。

### 2.7 统计学分析

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 25.0 软件包进行



与对照组比较: \*P<0.05 \*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001  
\*P<0.05 \*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001 vs control group

图3 人参皂苷 Rb<sub>2</sub> 对 ECV304 细胞增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 3 Effect of ginsenoside Rb<sub>2</sub> on proliferation of ECV304 cells ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

统计分析, 服从正态分布的计量资料组间比较采用单因素方差分析。

### 3 讨论

细胞增殖实验初筛结果显示人参皂苷 Rb<sub>2</sub> 和五味子乙素均有促进作用, 但只对人参皂苷 Rb<sub>2</sub> 进行进一步验证, 进一步验证前进行了空硅胶柱的筛选, 实验结果发现五味子乙素也与空硅胶柱结合, 因此不能确定五味子乙素是否与 VEGF 受体结合, 所以排除, 后期仍会对其研究。

CMC 是一种亲和色谱, 在 CMC 中制备的细胞膜可以均匀地包覆在二氧化硅球体表面, 作为亲和固定相。该方法已被证明能保持细胞膜蛋白的完整性和活性, 并能很好地模拟药物在体内的作用<sup>[12]</sup>。该技术仍可用于类过敏成分的筛选, 贺浪冲教授课题组自主研发出 Mass 相关的 G 蛋白偶联受体(MRGPRX2) 以及使用嗜碱性粒细胞(RBL-2H3) 进行致敏成分的筛选<sup>[13-14]</sup>; 与此同时也构建了以人胚肾细胞(HEK293) 为载体的 EGFR 高表达细胞株进行抑制血管新生的肿瘤实验<sup>[15]</sup>。CMC 通过受体与配体相互作用的原理, 达到对致敏成分或活性成分的特异性识别。CMC 具有高效、便捷、特异性强的优点, 但其仍然存在不足之处, 例如柱子寿命短, 柱间稳定性不强等, 对于这些缺点后期实验还会加以改进, 使该技术更加成熟, 更能广泛地用于复杂中药的筛选。

如今中医药对心血管疾病的治疗在血管新生方面的研究成为热点,有文献报道<sup>[16]</sup>,人参皂苷Rg<sub>1</sub>作为人参中最重要的成分,可以在体内诱导缺血心肌血管新生。由于基础研究成果较少,因此,本研究构建VEGF受体CMC,从人参皂苷及五味子木脂素中筛选出促血管新生的活性成分,并通过细胞增殖实验对所筛成分进行验证<sup>[17]</sup>,发现2.5~20.0 μg/mL的人参皂苷Rb<sub>2</sub>对血管新生有显著的促进作用且呈浓度相关性。

人参皂苷Rb<sub>2</sub>是注射用益气复脉(冻干)(YQFM)中的活性成分<sup>[18]</sup>,而YQFM主要用于心血管疾病的治疗,以往研究中多是从改善心功能指标、抗心肌缺血、氧化损伤等方面进行研究<sup>[19-20]</sup>,本实验筛选出人参皂苷Rb<sub>2</sub>能与VEGF受体相互作用、促进血管新生,因此,YQFM在后期的研究中可以从促血管新生这一方面开展研究。本研究结果再次验证CMC技术对复杂中药种活性成分筛选的可行性和专一性,也为改善心血管疾病的研究提供参考。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 陈啸飞. 中药活性组分的细胞膜色谱筛选和靶标鉴定方法学研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2014: 1-3.  
Chen X F. Methodology study of the screening of active ingredients from traditional chinese medicines by cell membrane chromatography and identification of their binding targets [D]. Shanghai: Acad J Second Mil Med Univ, 2014: 1-3.
- [2] 武姿彤, 杜武勋, 肖学风, 等. 细胞膜色谱法在中药活性成分筛选中的应用[J]. 天津中医药大学学报, 2017, 36(1): 71-75.  
Wu Z T, Du W X, Xiao X F, et al. Application of cell membrane chromatography in screening active components of traditional Chinese medicine [J]. Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2017, 36(1): 71-75.
- [3] 陈媛媛, 郭皎. 细胞膜色谱技术在中药活性成分筛选中的应用进展[J]. 中草药, 2012, 43(2): 383-387.  
Chen Y Y, Guo J. Application progress of cell membrane chromatography technology in screening of active components of traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2012, 43(2): 383-387.
- [4] 云辉, 梁树辉. 肿瘤血管生成方式研究进展[J]. 海南医学, 2010, 21(24): 123-127.  
Yun H, Liang S H. Research progress on tumor angiogenesis [J]. Hainan Med, 2010, 21(24): 123-127.
- [5] Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: Causes, consequences, challenges and opportunities [J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77(9): 1745-1770.
- [6] 王美玲, 刘华绪. HIF-VEGF-Notch信号通路在血管生成中的作用[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2021, 37(5): 332-336.  
Wang M L, Liu H X. Role of HIF-VEGF-Notch signaling pathway in angiogenesis [J]. China J Lepr Skin Dis, 2021, 37(5): 332-336.
- [7] 吴义春, 蔡逗逗, 汪晓庆, 等. 肿瘤血管生成方式的研究进展(综述)[J]. 安徽卫生职业技术学院学报, 2017, 16(2): 107-109.  
Wu Y C, Cai D D, Wang X Q, et al. Research progress of tumor angiogenesis (review) [J]. J Anhui Health Vocat Tech Coll, 2017, 16(2): 107-109.
- [8] Ruan G R, Ren H J, Zhang C, et al. Cardioprotective effects of QiShenYiQi dripping pills on transverse aortic constriction-induced heart failure in mice [J]. Front Physiol, 2018, 9: 324.
- [9] 樊飞燕, 张运克. 益气活血中药联合骨髓间充质干细胞促进缺血性脑卒中血管新生的作用与机制[J]. 中国组织工程研究, 2020, 25(13): 2060-2069.  
Fan F Y, Zhang Y K. Effect and mechanism of traditional Chinese medicine for replenishing qi and promoting blood combined with bone marrow mesenchymal stem cells in promoting angiogenesis in ischemic stroke [J]. Chin J Tissue Res, 2020, 25(13): 2060-2069.
- [10] 李晓蕊, 郭青龙, 卢娜. VEGFA/VEGFR2作用于血管内皮细胞途径及其抑制剂研究进展[J]. 药物生物技术, 2016, 23(3): 274-278.  
Li X R, Guo Q L, Lu N. Researching progress in the pathway acting on vascular endothelial cells of VEGFR2 and its signaling inhibitors [J]. Pharm Biotechnol, 2016, 23(3): 274-278.
- [11] Lin Y, Xu J, Jia Q, et al. Cell membrane chromatography coupled online with LC-MS to screen anti-anaphylactoid components from *Magnolia biondii* Pamp. targeting on Mas-related G protein-coupled receptor X2 [J]. J Sep Sci, 2020, 43(13): 2571-2578.
- [12] He X S, Sui Y, Wang S C. Application of a stepwise frontal analysis method in cell membrane chromatography [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2020, 1161: 122436.
- [13] Yang L, Zeng Y, Wang J, et al. Discovery and analysis the anti-pseudo-allergic components from *Perilla frutescens* leaves by overexpressed MRGPRX2 cell membrane chromatography coupled with HPLC-ESI-IT-TOF system [J]. Pharm Pharmacol, 2020, 72(6): 852-862.

- [14] Zhang T, Han S, Liu Q, et al. Analysis of allergens in tubeimu saponin extracts by using rat basophilic leukemia 2H3 cell-based affinity chromatography coupled to liquid chromatography and mass spectrometry [J]. Sep Sci, 2014, 37(22): 3384-3391.
- [15] 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.  
Wang S C, Sun M, Zhang Y M, et al. High expression of EGFR was detected by cell membrane chromatography-HPLC/MS screening the anti-EGFR active ingredients in monosaccharide [J]. Sci Sin B: Chimica, 2010, 40(6): 750-756.
- [16] 朱博杰, 杨清华, 卢健棋, 等. 中药促缺血心肌血管新生的研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(3): 649-651.  
Zhu B J, Yang Q H, Lu J Q, et al. Research progress of chinese medicine in promoting neogenesis of ischemic myocardial vascular [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2016, 43(3): 649-651.
- [17] 吕艳妮, 付 佳, 孔利云, 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.  
Lv Y N, Fu J, Kong L Y, et al. EGFR antagonism of the irisfloreantin from *Rhizoma Belamcandae* using CMC-Online-HPLC-IT-TOF MS system [J]. J Chin Mass, 2017, 38(4): 425-432.
- [18] Liu C, Ju A, Zhou D, et al. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of multiple chemical constituents in YiQiFuMai Injection by Ultra-Fast Liquid Chromatography Coupled with Ion Trap Time-of-Flight Mass Spectrometry [J]. Molecules, 2016, 21(5): 640.
- [19] 侯 健, 张家丰, 王秀丹, 等. 注射用益气复脉(冻干)不同给药途径对小鼠心肌梗死的改善作用研究 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(1): 32-41.  
Hou J, Zhang J F, Wang X D, et al. Effects of Yiqi Fumai Lyophilized Injection of different routes of administration against acute myocardial infarction mice [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(1): 32-41.
- [20] 鞠爱春, 罗瑞芝, 秦袖平, 等. 注射用益气复脉(冻干)药理作用及临床研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(3): 354-364.  
Ju A C, Luo R Z, Qin X P, et al. Pharmacological effects and clinical research progress of Yiqi Fumai Lyophilized Injection [J]. Drug Eval Res, 2018, 41(3): 354-364.

[责任编辑 兰新新]