

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

王新¹, 薛晖¹, 岳媛², 徐丹丹¹, 彭小丽^{1*}

(1. 山西医科大学药学院, 太原 030001; 2. 清华大学生命科学院, 北京 100083)

[摘要] 目的:从夏天无中筛选与高表达 β_1 肾上腺素受体(β_1 -AR)作用的活性成分,并考察其对 β_1 -AR 的抑制作用。方法:建立 β_1 -AR 细胞膜色谱与 UPLC/MS 联用分析方法筛选鉴别夏天无中的活性成分;用美托洛尔($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),药根碱($1, 5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理 β_1 -AR/CHO-S 24 h,换异丙肾上腺素($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)损伤细胞 10 h 后,ELISA 法测定活性成分对 β_1 -AR 下游因子 cAMP,PKA 水平的影响,评价其对 β_1 -AR 的抑制作用。结果:药根碱是夏天无中作用于 β_1 -AR 的活性化合物;细胞实验结果表明,与 ISO 组相比,药根碱和美托洛尔对 cAMP,PKA 水平均有下调作用($P < 0.01$)。结论:药根碱是夏天无中具有 β_1 -AR 抑制作用的活性化合物;建立的 β_1 -AR/CMC-offline-HPLC/MS 分析方法可快速有效筛选出作用靶点明确的活性成分,且筛选结果与生物效应相一致。

[关键词] β_1 肾上腺素受体; 细胞膜色谱法; 活性成分; 药根碱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)18-0065-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015180065

Targeted Screening of Active Ingredients from Corydalis Decumbentis Rhizoma Based on High Expression β_1 Adrenergic Receptor/Cell Membrane Chromatography Method WANG Xin¹, XUE Hui¹, YUE Yuan², XU Dan-dan¹, PENG Xiao-li^{1*} (1. School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100083, China)

[Abstract] **Objective:** To screen out the active components from Corydalis Decumbentis Rhizoma (CDR) and investigate their inhibitory effect on β_1 -AR. **Method:** A high expression β_1 adrenergic receptor/cell membrane chromatography-offline-ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry method (β_1 -AR/CMC-Offline-UPLC/MS method) was used to scan and identify the effective components from extracts of CDR. β_1 -AR/CHO-S cells were cultured in metoprolol ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and active components of jatrorrhizine (JAT) ($1, 5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h. Then, the cells were injured in DMEM containing ISO ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 10 h. the effect of the active components on β_1 -AR downstream factors cAMP and PKA was determined by ELISA kits to evaluate their inhibitory effect on β_1 -AR. **Result:** JAT was the active component of CDR and the experiment *in vivo* showed that in JAT and MT groups, concentrations of cAMP and PKA were lower than that in the ISO group ($P < 0.01$). **Conclusion:** JAT was successfully isolated and identified by the β_1 -AR/CMC-offline-UPLC/MS system from CDR and had an inhibitory effect on β_1 -AR. The β_1 -AR/CMC-Offline-UPLC/MS method can be used to screen out active components with clear action targets in a quick and effective manner. The screening results were found to be significantly consistent with its pharmacological effect.

[Key words] β_1 adrenergic receptor; cell membrane chromatography; active components; jatrorrhizine

肾上腺素 β_1 受体(β_1 -AR)属于典型 G 蛋白偶联受体,为心脏中强有力的受体^[1]。研究表明 β_1 -AR 的激活是导致心肌缺血损伤的重要因素^[2-4]。细胞膜色谱(CMC)是将具有生物活性的细胞膜

[收稿日期] 20141113(024)

[第一作者] 王新,在读硕士,从事药物分析,中药药效物质基础研究,Tel:18335172038,E-mail:13934043610@163.com

[通讯作者] * 彭小丽,副教授,硕士,从事中药药效物质基础研究,Tel:18636968582,E-mail:pengxl@tul.com.cn

与硅胶载体结合制成细胞膜固定相,利用色谱学技术研究药物与受体相互作用规律的受体动力学方法^[5]。直接采用动物组织细胞建立的 CMC 模型,通常由于分离的靶细胞不纯和靶标受体数量有限,限制了方法的特异性和准确性;而采用单一高表达受体细胞株建立的 CMC 模型,由于其受体密度和纯度的增加^[6],可以提高该方法精密度、特异性和专一性。

夏天无主要含有生物碱类化合物,包括药根碱、巴马汀、小檗碱等^[7]。现代药理学研究提示夏天无生物碱具有活血通络、行气止痛、祛风除湿之功效,主治风湿性关节炎、腰肌劳损、高血压病、脑血管意外引起的偏瘫^[8];另外,夏天无中的生物碱被认为可以抑制肾上腺诱发的自律性,具有抗心律失常的作用,但其发挥药效的物质基础及作用靶点尚不清楚。因此,本实验拟采用 β_1 -AR/CMC 筛选夏天无中作用于 β_1 -AR 的活性成分,并结合 UPLC/MS 对活性成分进行鉴定分析,从而为夏天无的药效物质基础和创新药物研究开发提供科学依据。

1 材料

LC-10AT 型高效液相色谱仪(Shimadzu 公司), ACQUITY UPLC™ 系统和 ACQUITY SQD 三重四级杆质谱仪(Waters 公司),ZZXT-A 型装柱机(大连日普利科技仪器有限公司),185ITC 型二氧化碳培养箱(SHEL-LAB 公司),680 型全自动定量酶标仪(BID-RAD 公司)。

Chinese Hamster Ovary-S 细胞(CHO-S 细胞)购自 Invitrogen 公司,高表达 β_1 -AR/CHO-S 细胞株由本实验室人员构建;夏天无购自山西药材公司,经山西医科大学药学教研室高建平教授鉴定为罂粟科植物伏生紫堇 *Corydalis decumbens* 的干燥块茎;异丙肾上腺素(ISO,批号 100166-201004),硝西泮(NP,批号 171225-200302),美托洛尔(MT,批号 100084-201102)对照品均购自中国食品药品检定研究院;药根碱对照品(JAT,批号 MUST-13041902)购自成都曼斯特生物科技有限公司;Cell Counting-8(CCK-8),cAMP,PKA ELISA 试剂盒均购自上海前尘生物技术有限公司;乙醇、甲醇、乙腈均为色谱纯,购自天津四友精细化学品有限公司;大孔球形硅胶购自青岛美高集团有限公司,二甲基亚砜购自 Sigma 公司,水为娃哈哈蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 夏天无提取液制备 取干燥后的夏天无粉末 1 g,置 10 mL 具塞锥形瓶中,加 95% 乙醇 10 mL,超声提取 20 min,滤过蒸干,加甲醇 1 mL 溶解,0.45

μm 微孔滤膜滤过,取续滤液即得。

2.2 对照品溶液的制备 取 ISO,MT,NP 对照品适量,精密称定,分别用甲醇制成含 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储备液;另取 MT,NP 对照品适量,用甲醇制成 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MT,NP 的混合对照品溶液。

2.3 β_1 -AR/CMC 色谱柱的制备 取细胞生长状态良好的高表达 β_1 -AR/CHO-S 细胞,4℃下用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞后,于 $1\ 000\times g$ 离心 10 min,弃上清液,取沉淀加入 10 mL 低渗液超声震荡 20 min,再于 $12\ 000\times g$ 离心 10 min,弃上清液,将沉淀与生理盐水 5 mL 混匀,即得高表达 β_1 -AR/CHO-S 细胞膜悬液。按照参考文献[9]的方法将制备好的细胞膜悬液与活化硅胶混合在装柱机上制备 β_1 -AR/CMC 色谱柱。将色谱柱装入专用柱套,连接至色谱系统使用。

2.4 β_1 -AR/CMC 分析 LC-10AT 型高效液相色谱仪(LC-10ATvp 型输液泵,SPD-10Avp 型紫外-可见光检测器,LC 色谱工作站),高表达 β_1 -AR/CMC 色谱柱(10 mm \times 2 mm,5 μm),柱温 37℃,流动相 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 7.4),流速 $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量 20 μL ,检测波长 MT 为 275 nm,NP 为 254 nm,夏天无提取物和药根碱为 280 nm,用流动相平衡色谱柱 2~3 h 后进样分析,所有分析过程均在 β_1 -AR/CMC 柱的活性期内进行。

2.5 UPLC/MS 分析 ACQUITY UPLC™ 系统(自动进样器,二元泵溶剂输送系统,PDA 二极管阵列检测器),ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm \times 50 mm,1.7 μm),流动相乙腈(A)-0.2% 乙酸溶液(B)梯度洗脱,流速 $0.3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,Waters ACQUITY SQD 三重四级杆质谱仪,ESI⁺ 离子源,喷雾电压 3.5 kV,脱溶剂气(N₂)温度 350℃,离子源温度 120℃。将 β_1 -AR/CMC 色谱柱流出的各组分分别收集,浓缩蒸干,用甲醇 700 μL 溶解,0.45 μm 微孔滤膜过滤,测定。

2.6 评价药根碱对 β_1 -AR 的抑制作用

2.6.1 细胞毒性测定 取处于对数生长期的 β_1 -AR/CHO-S 细胞,向培养基中分别加入 JAT 5 个剂量组(分别为 0.1,1,5,10,20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)10 μL 及 MT(10,20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),继续培养 24 h。CCK-8 法测定细胞毒性,酶标仪于 450 nm 处测定各孔吸光度。

2.6.2 药根碱对 cAMP,PKA 的影响 37℃,5% CO₂ 培养 β_1 -AR/CHO-S 细胞 24 h,除正常组(N)和 ISO 模型组外其他组换含 MT(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),JAT(1,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)培养基培养 24 h 后;除 N 组,各加入 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ISO 继续培养 10 h;0.5% 胰酶消化,

磷酸缓冲盐 (PBS) 洗 3 遍, $600 \times g$ 离心 10 min。沉淀用 PBS 1 mL 重悬, 细胞超声破碎仪破膜后, $12\ 000 \times g$ 离心 30 min, 取上清液。ELISA 法测定活性化合物对 cAMP, PKA 等 β_1 -AR 下游信号因子水平的影响, 评价活性化合物对 β_1 -AR 的抑制作用。

2.7 统计处理 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素分析系统差分析。

3 结果

3.1 β_1 -AR/CMC-offline-UPLC/MS 方法适应性和可靠性的考察 通过分别进样 ISO 和 MT 对照品溶液考察不同 β_1 -AR/CMC 柱的重复性, 其中化合物峰的保留时间差异通过 RSD 表示。结果表明 ISO 和 MT 保留时间的 RSD 分别为 11.7% 和 13.2% ($n = 6$), 色谱柱制备的重复性符合分析要求。

采用 NP 和 MT 混合对照品考察 β_1 -AR/CMC 的可行性的色谱见图 1。图 1-A 为 2 种药物在 β_1 -AR/CMC 色谱柱上的保留情况。MT 在 β_1 -AR/CMC 柱上能特异性保留是由于其与 β_1 -AR 的相互作用; NP 在 β_1 -AR/CMC 柱上无保留是由于其与苯二氮卓受体发生作用, 而不与 β_1 -AR 相互作用。混合对照品在纯硅胶色谱柱系统中均无保留 (图 1-B) 表明药物与硅胶固定相几乎无作用。将两个组分收集浓缩, 注入 UPLC/MS 分析系统进行鉴定, 质谱数据表明, R_0 和 R_1 分别为 NP 和 MT。结果表明, 在 β_1 -AR/CMC 上, 与细胞膜受体相互作用的组分可以选择性地保留下来, 而无作用的杂质成分则被直接排出。

3.2 夏天无中活性成分筛选 夏天无提取液进行分析的色谱见图 2。图 2-A 中明显可见保留组分 R_1 , 将保留组分收集, 浓缩并注入到 UPLC/MS 系统进行分离和鉴定; 图 2-C 中 $R_{1,1}$ 峰为 R_1 组分的主要保留成分。从 UV 和 MS (图 2-D) 及文献所报道的数据分析^[10], $R_{1,1}$ 峰为药根碱, 通过比较图 2-E 可知, 药根碱来源于夏天无提取物中, 可与 β_1 -AR 相互作用。因此, 药根碱是夏天无提取物的主要保留成分, 但其对 β_1 -AR 的抑制作用需进一步验证。

3.3 细胞水平评价活性化合物 经 $0.1, 1, 5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 JAT 处理后, 细胞活力分别为 $(99.30 \pm 0.04)\%$, $(99.43 \pm 0.06)\%$, $(99.56 \pm 0.04)\%$, 表明其对 β_1 -AR/CHO-S 细胞活力没有影响, 而经 $10, 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 JAT 处理后, 细胞活力分别为 $94.82\% \pm 0.84\%$, $92.22\% \pm 0.02\%$, 表明其对 β_1 -AR/CHO-S 细胞活力有影响 ($P < 0.05$); 经 $10, 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MT 处理后, 细胞活力分别为 $99.80\% \pm 0.02\%$, $99.47\% \pm 0.02\%$, 表明 $10, 20$

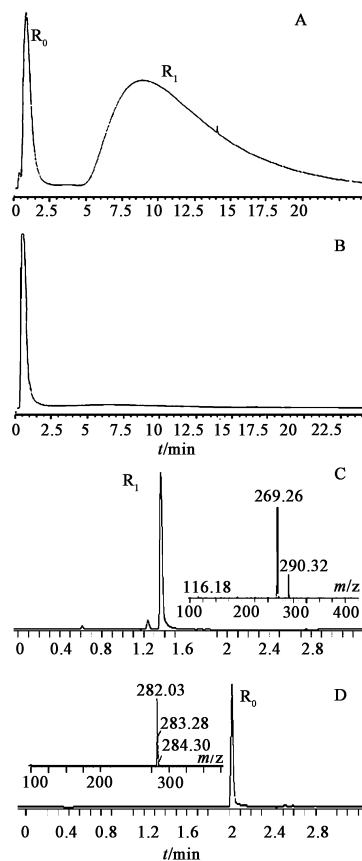


Fig. 1 Chromatograms of mixed standard solution with β_1 -AR/CMC-offline-UPLC/MS method

图 1 NT 和 MT 混合对照品溶液获得 β_1 -AR/CMC-offline-UPLC/MS

Fig. 1 Chromatograms of mixed standard solution with β_1 -AR/CMC-offline-UPLC/MS method

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MT 对 β_1 -AR/CHO-S 细胞活力均没有影响。

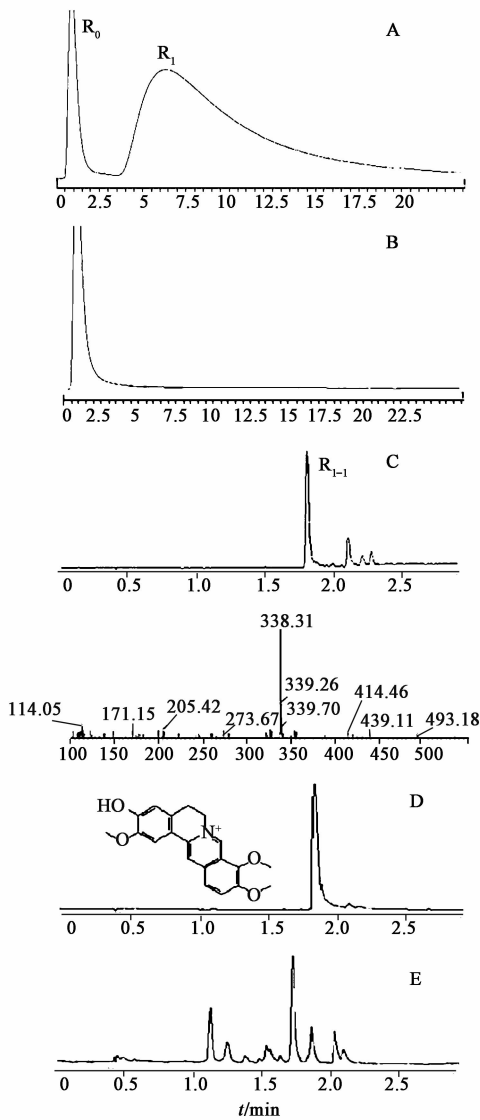
由表 1 可得, ISO 组胞内 cAMP, PKA 含量比 N 组明显升高 ($P < 0.01$)。而 MT 和不同剂量组 JAT 的胞内 cAMP, PKA 含量比 ISO 组明显降低 ($P < 0.01$), 表明药根碱可以降低胞内 cAMP, PKA 水平, 对 β_1 -AR 有抑制作用。

表 1 药根碱对 cAMP, PKA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 JAT regulates level of cAMP and PKA ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	药根碱 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	cAMP / $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	PKA / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
N	-	$9.88 \pm 0.76^{2)}$	$2.59 \pm 0.02^{2)}$
ISO	-	$65.8 \pm 4.01^{1)}$	$14.48 \pm 0.33^{1)}$
MT	10	$21.22 \pm 2.36^{2)}$	$5.33 \pm 0.86^{2)}$
JAT	1	$44.68 \pm 3.38^{2)}$	$10.09 \pm 0.41^{2)}$
JAT	5	$33.71 \pm 6.91^{2)}$	$5.23 \pm 0.75^{2)}$

注: 与正常组相比¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组相比²⁾ $P < 0.01$ 。



A. 夏天无提取物的 β_1 -AR/CMC, R_1 组分被收集; B. 夏天无提取物在纯硅胶固定相色谱系统中的色谱; C. R_1 UPLC/MS, R_{1-1} 为主要保留峰, 被鉴定为药根碱; D. 夏天无提取物直接在 UPLC/MS 的 UPLC

图 2 夏天无提取物 β_1 -AR/CMC-Offline-UPLC/MS

Fig. 2 Chromatograms of CDR extract with β_1 -AR/CMC-offline-UPLC/MS method

4 讨论

实验结果显示夏天无提取物与美托洛尔具有相似的色谱保留行为, 经 UPLC/MS 鉴定其活性成分为药根碱, 并通过其对 cAMP, PKA 的下调作用进一步验证了药根碱对 β_1 -AR 的拮抗作用。体外细胞膜色谱筛选结果结合细胞实验, 我们可以得到药根碱是夏天无提取物中潜在的 β_1 -AR 拮抗剂。

本研究所建立的 β_1 -AR/CMC-offline-UPLC/MS 分析方法, 以 β_1 -AR/CMC 模型为核心技术, 不仅具有操作简便, 高通量筛选等优势, 同时也提高了目标

成分的特异性、敏感性和选择性; 结合 UPLC-MS, 弥补了 CMC 无法鉴别分析活性化合物的不足; 并通过细胞实验对筛选结果加以验证, 提高了实验方法的准确度。该方法的建立为快速有效筛选中药中活性成分提供了新途径。

[参考文献]

[1] Seqqat R, Guo X, Rafiq K, et al. Beta1-adrenergic receptors promote focal adhesion signaling downregulation and myocyte apoptosis in acute volume overload [J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 53 (2): 240-249.

[2] Sorrentino S A, Doerries C, Manes C, et al. Nebivolol exerts beneficial effects on endothelial function, early endothelial progenitor cells, myocardial neovascularization, and left ventricular dysfunction early after myocardial infarction beyond conventional β_1 -blockade [J]. J Am Coll Cardiol, 2011, 57 (5): 601-611.

[3] Zhang X, Szeto C, Gao E, et al. Cardiotoxic and cardioprotective features of chronic β -adrenergic signaling [J]. Circ Res, 2013, 112 (3): 498-509.

[4] Winter J, Brack K E, Ng G A. The acute inotropic effects of cardiac contractility modulation (CCM) are associated with action potential duration shortening and mediated by β_1 -adrenoceptor signalling [J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 51 (2): 252-262.

[5] 陈蓁, 王锐平, 贺浪冲, 等. 细胞膜色谱法筛选红花中的有效成分 [J]. 陕西中医, 2004, 25 (7): 643-644.

[6] Du H, Ren J, Wang S C, et al. Cell membrane chromatography competitive binding analysis for characterization of α_1A adrenoceptor binding interactions [J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 400(10): 3625-3633.

[7] 曾文亮, 张玲, 尚立霞. 夏天无化学成分的研究 [J]. 中草药, 2005, 36 (5): 665-666.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 173.

[9] Yue Y, Xue H, Wang 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, 2014, 37(3): 244-249.

[10] 邓雅婷, 廖琼峰, 毕开顺, 等. 黄连-吴茱萸药对化学成分 HPLC-DAD-MS 分析 [J]. 药学学报, 2008, 43(3): 299-302.

[责任编辑 顾雪竹]