

细胞膜色谱与线粒体膜色谱技术的发展及应用

赵壮^a, 范强^a, 苏武^a, 陈乐融^a, 李华^a, 葛帅^b, 孔宇^{a*}, 龙建纲^{a*} (西安交通大学, a. 生命科学与技术学院, 线粒体生物医学研究所, 生物医学信息工程教育部重点实验室; b. 药学院, 西安 710049)

摘要: 细胞膜色谱法是近年来迅速发展的一种生物亲和色谱方法。其以包覆含受体膜的载体为固定相, 将配体与膜受体间相互作用转化为色谱过程。该方法具有生物仿生、高效、低成本等优势, 已被广泛用于药物分子筛选和受体与配体相互作用研究。线粒体作为重要的细胞内膜系统, 膜结构中分布有多种药物靶点, 线粒体膜色谱技术近期也有重要研究进展。笔者综述了细胞膜色谱技术及其应用方面的进展, 也对基于细胞膜色谱理论的线粒体膜色谱技术进行简介和展望。

关键词: 细胞膜色谱; 线粒体膜色谱; 药物筛选; 药物受体相互作用

doi: 10.11669/cpj.2024.03.003 中图分类号: R917; Q731 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2024)03-0210-10

Development and Application of Cell Membrane Chromatography and Mitochondrial Membrane Chromatography Technology

ZHAO Zhuang^a, FAN Qiang^a, SU Wu^a, CHEN Lerong^a, LI Hua^a, GE Shuai^b, KONG Yu^{a*}, LONG Jianguang^{a*} (a. School of Life Science and Technology, Center for Mitochondrial Biology and Medicine, The Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education; b. School of Pharmacy, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

ABSTRACT: Cell membrane chromatography is a bioaffinity chromatography method which has been developing rapidly in recent years, where the carriers coated with receptor-containing biomembrane are packed to stationary phase and the bioaffinity between compound and membrane receptor presents in chromatography process. This method has the advantages of biomimetic, high efficiency and low cost, and has been widely used in drug screening and identifying the affinity between membrane receptor and candidate ligand. Mitochondria, a crucial functional intracellular membrane system, with various drug targets residing in membrane. Recently, significant research advancements have been made in mitochondrial membrane chromatography technology. In this paper, the recent progresses and applications of cell membrane chromatography and mitochondria membrane chromatography are reviewed.

KEY WORDS: cell membrane chromatography; mitochondrial membrane chromatography; drug screening; drug-receptor interaction

从天然产物中发现药物的传统方法是先从复杂混合物中分离纯化组分, 再对各组分的生物活性进行单独分析^[1], 该方法耗时且工作量巨大。为了使发现和分析药物的流程更加方便快捷, 贺浪冲教授于1996年首次提出和建立了细胞膜色谱法 (cell membrane chromatography, CMC)^[2], 将色谱学、细胞生物学和药理学相结合, 使体内药物-受体相互作用转化为色谱过程 (图1), 具有筛选检测快速, 灵敏度高等特点, 在混合物中多种效应物质的同时筛选以及药物与受体相互作用研究方面有巨大的应用潜力^[3]。

CMC技术属于亲和色谱技术, 主要利用细胞膜和硅胶表面硅羟基 (Si-OH) 的吸附作用制备细胞膜色谱固定相 (cell membrane stationary phase, CMSP), 其示意图见图2A, 该固定相保持了细胞膜的完整性、膜受体的三维结构以及生物活

性。在以CMSP为固定相的色谱分析过程中, 不同配体 (混合物中的各种潜在效应物) 与生理状态下的膜受体存在作用力的差异, 从而显现出差异化的保留特征, 最终实现色谱分离和潜在活性物质确认目的。

CMSP的制备方法由贺浪冲教授课题组建立^[4], 核心步骤如下: 首先是细胞膜的制备, 将来自组织或培养的细胞在低渗溶液中使用超声设备破碎, 再通过差速离心法分离得到细胞膜。然后将得到的细胞膜与硅胶载体混合, 使细胞膜在硅胶表面充分吸附达到平衡, 即可得到CMSP。制备好的CMSP通常利用扫描电镜等手段进行表征。与未吸附细胞膜硅胶 (图2B) 相比, CMSP (图2C) 表面有明显膜结构吸附于硅胶表面。

笔者对CMC技术近年来的发展现状做了综述, 对该技术在药物筛选和药物受体相互作用领域的研究做了梳理归

基金项目: 载人航天工程航天医学实验领域项目资助 (HYZXHM01023)

作者简介: 赵壮, 男, 硕士研究生 研究方向: 线粒体膜色谱法的建立及应用 * **通讯作者:** 龙建纲, 男, 博士, 教授, 博士生导师 研究方向: 衰老及相关疾病发生的线粒体机制及其早期干预策略 Tel: (029) 82664232; 孔宇, 男, 博士, 教授 研究方向: 功能化核酸的研究及应用、生化分析、疾病检测相关应用研究 Tel: (029) 82668463

纳,并对 CMC 技术未来的发展做了展望。

1 CMC 技术研究进展

CMC 技术自建立以来,经过多年的发展,已成为药物筛选及配体与受体相互作用研究的有力工具,但也面临了一些发展限制和瓶颈。如:①膜蛋白易脱落、失活,非特异性吸附

导致色谱柱稳定性差,柱寿命短^[5];②分离得到的有效成分鉴定难;③细胞膜受体含量低,细胞用量大,膜制备成本较高;④药物作用靶向性和作用机制仍不十分明确等。针对以上问题,多个团队针对上述难题进行了有益的探索,给出了多种解决方案,现对该技术在以上领域的改进措施进行梳理。

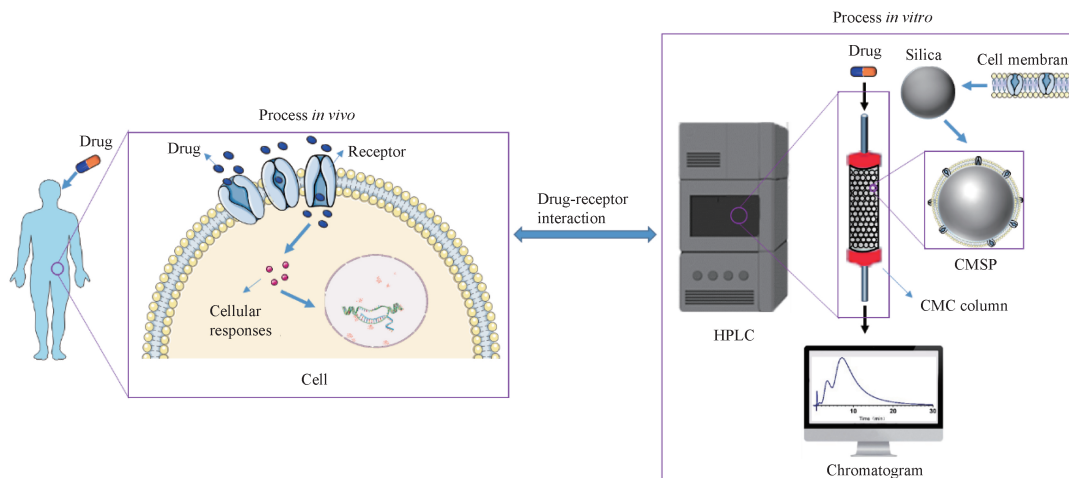


图1 细胞膜色谱(CMC)技术模拟体内“药物受体”作用的示意图^[2]

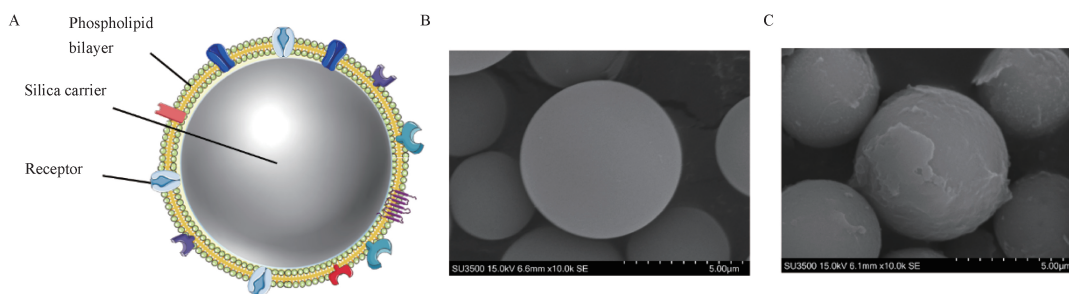


图2 细胞膜色谱固定相(CMSP)示意图(A)、硅胶扫描电镜图(B)及CMSP扫描电镜图(C)

1.1 膜-载体结合方式

CMC 技术的关键之一在于 CMSP 的制备。在制备 CMSP 过程中,细胞膜与载体之间的不同结合方式会对 CMSP 的作用效果会产生不同影响。传统的结合方式依靠硅胶与细胞膜之间的物理吸附作用,但通过该方式吸附于硅胶上的细胞膜受体蛋白容易脱落,影响了筛选结果的稳定性。同时,吸附细胞膜的过程是非特异性的,CMSP 中目标受体的纯度无法得到保证。目前的改进策略主要集中于修饰硅胶表面,通过多种途径增强其结合细胞膜的能力。

1.1.1 物理吸附 Wu 等^[6]利用聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)和聚二甲基二烯丙基氯化铵(poly dimethyl diallyl ammonium chloride, PDAC)在硅胶表面形成了有良好生物相容性^[7]和稳定性的 PVA-PDAC 共聚物,改性后的硅胶对细胞膜的吸附力增强,表面细胞膜的覆盖率相比正常细胞膜色谱柱增加了约 30%,细胞膜色谱柱的稳定性也有所提升。

Zhang 等^[8]等利用了石墨烯量子点(graphene quantum dots, GQDs)来修饰硅胶表面,依据 GQDs 可负载多种官能团、比表面积高、界面特性良好等特点^[9],可将 CMC 柱的使用寿命延长至 8 d 以上。

1.1.2 共价连接 上述报道中,细胞膜和载体(硅胶)之间的结合力主要源于物理吸附,为了进一步提高结合能力,Ding 等^[10]采用了共价键连接的方法,使用 3-氨基丙基三乙氧基硅烷(3-aminopropyl triethoxy silane, APTES)处理硅胶使其表面携带氨基,再用戊二醛使硅胶表面醛基化。最终利用醛基与细胞膜中的氨基在室温环境中易发生醛氨缩合反应,使得细胞膜共价结合在硅胶上,极大增强了细胞膜受体在硅胶表面的附着效果。该方法制备的细胞膜色谱柱的使用寿命从原有的低于 3 d 延长到 12 d 以上,且色谱柱在前 3 d 内的重现性也显著提高。利用这种改性方法,Wang 等^[11]开发了 APTES 修饰的 MCF7/CMC 系统实现了对元胡和白芷中活性成分的筛选。Liu 等^[12]开发了 APTES 修饰的

P-gp-MCF7/CMC 系统从黄芩中筛选出了抗肿瘤的活性成分黄芩苷。

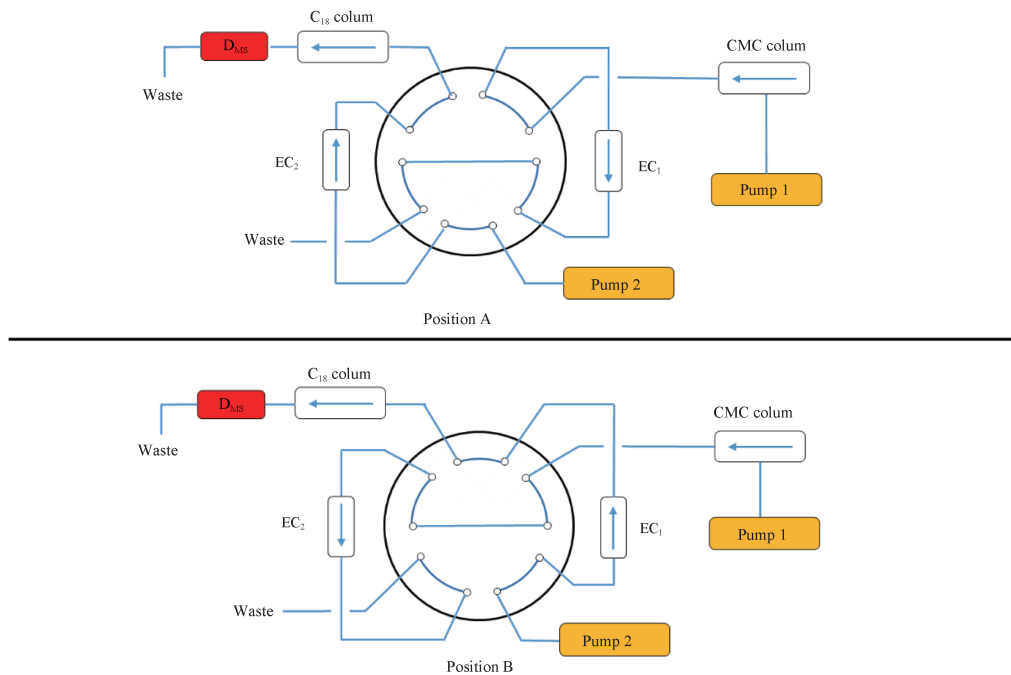
同样是采用硅胶与细胞膜共价连接的思路,Gu 等^[13] 先利用 3-巯基丙基三甲氧基硅烷(3-mercaptopropyl trimethoxy silane, MPTS)使硅胶表面携带巯基,再用 *N*- γ -马来酰亚胺基丁酰-氧琥珀酰亚胺酯处理使硅胶表面获得活化的酯基,游离的活性酯基能够与细胞膜中的氨基共价结合,使得细胞膜稳定地附着在了硅胶表面。与 APTES 改性的方法相比, MPTS 的改性方法显示出以下优点:①解决了 APTES 改性法中存在的戊二醛的自聚合问题;②巯基与马来酰亚胺的反应活性高于氨基与醛基;③反应过程更温和、更快。

1.1.3 特异性连接 针对结合细胞膜过程中缺乏特异性导致目标受体纯度不高的问题,Fu 等^[14] 利用 DNA 烷基转移酶衍生物标签(SNAP-tag)技术进行了改进,SNAP-tag 是根据 O⁶-鸟嘌呤烷基-DNA 烷基转移酶进行突变改造,可以特异性并快速地与苯甲基鸟嘌呤衍生物发生共价键反应的标签蛋白。SNAP-tag 技术是一种常用的特异性偶联技术,常用于在蛋白表面共价连接效应分子^[15]。该团队首先将 SNAP 标签与 EGFR 受体的 N 端融合,然后用苄基鸟嘌呤(benzylguanine, BG)衍生物修饰大孔硅胶,利用 SNAP 标签与 BG 衍生物的特异性结合,实现 EGFR 膜受体与硅胶之间的特异性共价连接。相较于其他连接方式,它最大限度地减少了

蛋白质的非特异性附着。同样是利用 SNAP-tag 的连接方式,该团队的 Jia 等^[16] 在 MrgX2 受体的 C 端引入 SNAP-tag,构建的新型 CMC 模型从石楠中筛选出了紫草素和乙酰紫草素两种抗假过敏化合物。除了有选择性吸附的优势,该方法在固定相制备时间上也大大缩短,从开始孵育膜蛋白至吸附饱和只需要 6 min,相比传统的静置过夜的孵育方式有明显进步。

1.2 分离鉴定方式

CMC 技术的核心作用之一在于筛选与膜受体相互作用的有效成分,如何快速且低成本分离分析有效成分是该技术领域研究热点之一。最初的 CMC 方法是单维的分离系统,无法直接得到筛出组分的具体信息,后续筛选物的鉴定需要借助其他仪器协助,过程易导致信息丢失。随着分析仪器的不断进步,研究人员将 CMC 与质谱技术相结合,建立起二维的 CMC 分析系统,Hou 等^[17] 利用 1 个 10 通阀和两个富集柱将第一维的 MDA-MB-231-CMC 和第二维的 HPLC-MS 进行连接,形成了二维 CMC 色谱系统,其工作原理见图 3:在 Position A,样品通过 MDA-MB-231-CMC 系统筛选。筛选完成并且在富集柱 1 中富集后,通过切换阀将系统切换到 Position B,将保留组分转入 HPLC/MS 系统进行分析。利用该系统在厚朴中筛选活性抗乳腺癌化合物:厚朴酚(magnolol),和厚朴酚(honokiol)。二维 CMC 色谱系统缩短了分析过程用时,同时也避免了信息丢失,已经应用于许多研究中^[18-21]。



EC_{1/2} - 富集柱 1/2; D_{MS} - 质谱检测器。

图 3 二维 CMC 色谱系统示意图

1.3 膜固定相制备

细胞膜的处理和制备是 CMC 技术的重要环节之一。传统 CMC 方法使用普通细胞系的细胞膜,由于膜受体含量低等

原因,固定相制备时细胞需用量较大,通常在 1×10^7 以上^[22],对于获取受限的细胞来说,该方法难以实施。也有采用过表达目标受体细胞系来制备细胞膜色谱填料的报道,但方法耗

时且成本高,影响了该技术推广应用。为解决上述问题,研究者在膜色谱固定相形式及制膜方式等方面开展了有益尝试。

1.3.1 细胞膜毛细管色谱法 Tang 等^[23]提出了细胞膜毛细管色谱法(cell membrane capillary chromatography, CMCC), 后也称作 micro-CMC (mCMC) 法。该团队将小鼠的胰岛细胞膜固定在石英毛细管内壁上。为避免吸附力弱导致细胞膜脱落,他们结合了共价连接的方法,在毛细管内壁上修饰了醛基,醛基与细胞膜中的氨基共价连接,稳定性得到了保障。他们利用这种新方法测试了3种降血糖药物,均有良好的保留。CMCC 相比传统方法,减少了细胞用量,单个柱子消耗 7×10^6 个细胞,同时缩短了平衡用时。

相比 CMC, CMCC 减少了细胞用量但牺牲了一定的分辨率和柱寿命。为了改进这一点, Zhang 等^[24]在以上基础上使用多孔层开管(porous layer open tubular, PLOT)代替普通二氧化硅毛细管,相比普通毛细管,保留效果得到增强。与传统 CMC 比较,它提供与 CMC 相似的色谱保留和稳定性,但细胞膜消耗量比 CMC 低 460 倍以上。Xu 等^[25]在 2017 年报道了用 *N*-羟基琥珀酰亚胺修饰的 PLOT 毛细管的方法,修饰过后的 PLOT 毛细管可以与细胞膜共价连接,保证低细胞用量的同时进一步提高了色谱柱的使用寿命。Wang 等^[26]将高强度、耐高压的聚醚醚酮毛细管作为 CMCC 的柱材料,并使用 PVA 和戊二醛对其进行修饰,使其保留因子比普通 CMC 高 1.5 倍,而细胞消耗比普通 CMC 低 1 000 倍,且寿命至少可以延长到 20 d。

1.3.2 原位合成膜蛋白 为了使制备细胞膜的过程更加低成本且高效率, Gu 等^[27]开发的原位合成膜蛋白亲和色谱法,在膜的来源上做出了创新。由于从细胞获得细胞膜作为膜蛋白的来源会导致特异性和丰度低,该团队基于无细胞蛋白合成技术(cell-free protein synthesis, CFPS)^[28],通过特定的 cDNA 序列以及脂质体和细胞提取物,快速且高通量地合成了目标蛋白 PDGFR β ,且所合成的蛋白定向地插入到了硅胶表面的脂质体当中。该方法的优势在于突破了细胞本身限制,能够快速廉价且大量地获得目标膜受体,极大地提高了效率。

1.4 线粒体膜色谱技术

除细胞膜含有膜受体外,细胞内线粒体等诸多细胞器都有丰富的膜受体,有望基于细胞内膜系统,发展线粒体膜色谱及各种细胞器膜色谱技术。线粒体具有双层膜结构,是细胞进行三羧酸循环、脂肪酸代谢、氧化磷酸化等多项重要的生理和生化过程的重要细胞器,其代谢过程也与细胞凋亡密切相关^[29]。线粒体功能障碍与许多疾病,如神经退行性疾病^[30]、心血管疾病^[31]、癌症^[32]、胰岛素抵抗导致糖尿病和肥胖症^[33]等有关。研究表明这些线粒体肌病的病因与外膜和内膜中特定受体和转运蛋白的表达和功能的变化有关。因此,线粒体膜蛋白是药物分子的潜在靶标,可以对与线粒体功能障碍相关的疾病起到治疗和调节作用^[34]。笔者所在团队的刘建康教授首次提出线粒体营养素的概念^[29],即能够通过靶向改善线粒体结构功能完整、调节线粒体功能的一类小分子物质。基于线粒体营养素理论,筛选靶向线粒体的效

应分子,对于线粒体功能障碍相关疾病的防治具有重要的意义。

线粒体膜也可以在提纯后通过物理吸附或者化学连接方法结合在硅胶或者其他固定相上,进而通过色谱技术研究线粒体膜与药物的相互作用,即线粒体膜色谱(mitochondria membrane chromatography, MMC)技术,其研究思路见图 4。与 CMC 法相比,线粒体膜色谱技术可以更加精确、更具靶向性地筛选线粒体效应分子,减少了筛选的盲目性,同时也有助于其效应分子的作用机制研究。

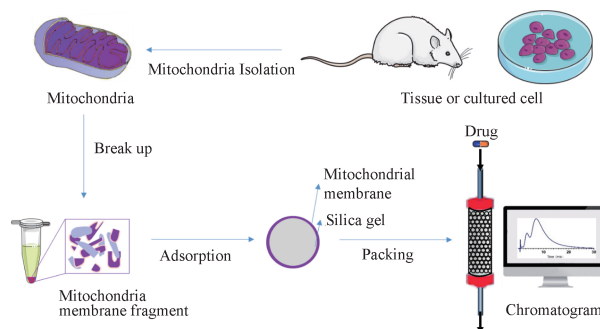


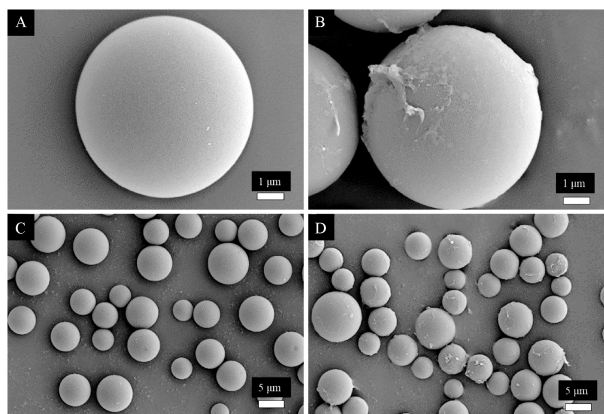
图 4 线粒体膜色谱技术流程

2015 年, Habicht 等^[35]利用了 U-87MG 和 HEK-293 细胞,在之前制备细胞膜亲和色谱柱以及细胞核膜色谱柱的方法的基础上^[36-37],制备了线粒体膜亲和色谱柱。他们先对提取得到的线粒体增溶处理,然后通过透析去除增溶缓冲液,最后将得到的膜碎片吸附在固定化人造膜(immobilized artificial membrane, IAM)颗粒和开管(open tubular, OT)的内壁上。而后利用双嘧达莫,格列苯脲和双氯芬酸等阳性药物在色谱柱上的色谱行为验证了线粒体的外膜和内膜都被有效地吸附在了固定相载体上。在之后的 2017 年, Singh 等^[38]将猴子骨骼肌和人血小板的线粒体膜固定在了色谱柱上,并且通过色谱方法发现在骨骼肌线粒体膜色谱柱上可以进行 ATP 的水解,验证了该方法所制得的固定相具有生物学活性。但该方法制备过程繁杂,耗时,成本高,增溶和透析的过程对膜结构有较大的破坏,且仅测定了已知阳性药物结合能力,未能应用于筛选药物。

笔者所在团队尝试利用含有丰富线粒体大鼠肝脏组织,将取得的线粒体膜碎片吸附在硅胶载体表面,成功制备出线粒体膜固定相(mitochondrial membrane stationary phase, MMSP)并用于线粒体效应分子的筛选。MMSP 电镜图像见图 5。

2 CMC 应用于复杂组分中活性成分的分离

近年来,中药由于其良好的治疗效果越来越受到全世界的认可和关注^[39]。但中药的化学组成复杂,如何快速筛选并鉴定其中的活性成分也成为中药药效物质基础研究的难题之一。CMC 技术因具有快速识别和分离活性成分的优势,在中药的活性组分筛选领域得到了广泛应用。



A - 硅胶, $\times 10\ 000$; B - MMSP, $\times 10\ 000$; C - 硅胶, $\times 2\ 000$; D - MMSP, $\times 2\ 000$ 。

图5 硅胶与线粒体膜固定相(MMSP)扫描电镜图

在表1中按筛选出的活性成分的效用不同分类统计出了近5年来CMC用于中药等复杂组分活性成分筛选的应用研究,总结了其所选用的细胞系,筛选系统,以及或活性成分等。

不同细胞的细胞膜表面的受体不同,因此多类细胞(膜)被用于不同功能的药物成分的筛选,如PC-3^[42]、MCF7^[111]、DU145^[44]、HepG2^[19]等不同类型的癌细胞细胞系被用于相关癌症的药物分子筛选。但普通细胞的筛选方式无法确定药物分子作用的具体靶点,且普通细胞表面受体种类丰富,导致筛选过程中易出现假阳性。为了进一步提升筛选的准确性和靶向性,建立过表达目标受体的细胞系,提高目标受体在固定相中的相对含量,已成为相对应用较广的研究方法。已有VEGF-HEK293细胞系^[40]、EGFR-HEK293细胞系^[41](表1)、GPC3-SK-Hep1细胞系^[47]等报道,分别实现了对特定的肿瘤治疗靶点的药物筛选。从表1看,近年来约60%的筛选工作是基于过表达特定受体的细胞,除了准确性等优势外,过表达目标受体的细胞膜色谱在保留时间和柱寿命方面有显著提升,也增强筛选有效组分的能力。

3 膜色谱应用于药物与受体的相互作用

药物靶点的类型分为受体、酶、核酸等。受体对生物活性物质具有识别和结合能力。大约有40%的药物与相应的受体相互作用以发挥药理作用。因此,研究药物与受体之间的相互作用是非常必要的,有助于理解药物的作用机制^[68]。

目前,研究药物与受体相互作用的方法主要有放射配基结合分析法^[69]、表面等离子体共振技术^[70]、荧光共振能量转移^[71]、等温滴定量热技术^[72]、微量热泳动^[73]、石英晶体微量天平^[74],以及亲和色谱法等。

亲和色谱利用小分子配体与受体、酶与底物、抗原与抗体之间的高特异性相互作用,或者其他的分子相互结合的能力对生物分子进行纯化和富集^[75]。一般的亲和色谱法是将纯化的受体通过化学键合的方法结合到硅胶表面^[76],这样的制备方法在化学键合中可能会影响受体的三、四级结构,从而影响受体对药物的选择性。相比较于其他的亲和色谱

方法,CMC保持了细胞膜的最大完整性和膜受体的三维结构,以及周围环境和酶活性,能够保证受体蛋白的结构和活性不会被破坏^[77]。因此相比于其他的方法更能够准确地体外模拟药物与受体的相互作用。CMC目前广泛应用于药物与受体之间相互作用的研究,研究人员结合CMC系统开发出了多种分析方法,如前沿分析法,竞争置换法,基于CMC的相对标准法和逐步前沿分析方法等等。

3.1 前沿分析法

前沿分析(frontal analysis, FA)常被用于研究药物与活性生物配体之间的亲和相互作用。该方法通常将被分析样品作为流动相,随着流动相穿过色谱柱,分析样品与受体结合逐渐饱和,从而导致流出色谱柱的分析样品不断增多,形成一条特征性的突破曲线^[78]。贺浪冲教授课题组的Zeng等^[79]利用CMC结合前沿分析确定药物与 α_{1D} -AR受体的平衡解离常数(K_D),创造一种替代传统方法的可靠方法来定量研究药物-受体相互作用。Du等^[80]将VSM/CMC模型与前沿分析的方法结合,测定了钙拮抗剂与L型钙通道相互作用的 K_D 值。Wei等^[81]等利用了该方法,通过CMC前沿分析确定7种生物碱与 α_{1A} -AR的亲和力,其亲和力大小随着 K_D 值的上升而下降,它们的 K_D 值按升序排列如下:异莲心碱(isoliensinine) $(2.87 \pm 0.63) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,异钩藤碱(isorhynchophylline) $(3.06 \pm 0.58) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,内啡肽(neferine) $(3.29 \pm 0.81) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,莲心碱(liensinine) $(3.38 \pm 0.87) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,钩藤碱(rhynchophylline) $(3.56 \pm 0.83) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,异去氢钩藤碱(isocorynoxine) $(3.62 \pm 1.20) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,去氢钩藤碱(corynoxine) $(16.47 \pm 6.38) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.2 竞争置换法

竞争置换法,通常是将靶点已知的配体作为竞争剂,考察样品的结合能力与竞争剂浓度之间的关系^[82]。该方法的优点是可以分析药物作用的位点,常用于检测不同药物是否具有相同的作用靶点。它与前沿分析的不同在于将待检测的样品作为流动相,将靶点已知的配体进行进样。Yang等^[83]等利用该技术首先构建了EGFR-HEK293/CMC模型,使用吉非替尼(gefitinib)作为EGFR受体的特异性探针进行竞争性结合实验。其竞争置换能力顺序为吉非替尼 $(0.849 \pm 0.11) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} >$ 厄洛替尼(erlotinib) $(1.07 \pm 0.02) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} >$ 卡纳替尼(canertinib) $(1.41 \pm 0.07) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} >$ 阿法替尼(afatinib) $(1.80 \pm 0.12) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} >$ 凡德他尼(vandetanib) $(1.99 \pm 0.03) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该顺序与通过FA得到的值的顺序和通过分子对接获得的亲和力大小顺序相一致。该团队后续^[84]又构建了VEGFR2-HEK293/CMC模型,以苹果酸舒尼替尼(sunitinib malate)为标记物进行竞争性结合研究,检测TPD7在VEGFR2上的结合位点。结果显示,TPD7与苹果酸舒尼替尼在VEGFR2上具有相同的结合位点,这与分子对接模拟所得到的结果一致,TPD7的 K_D 值为 $(0.29 \pm 0.02) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 1 CMC 应用于筛选中药及天然产物等复杂组分中活性成分的研究

效用	编号	细胞系	中药	CMC 筛选系统	活性成分	参考文献
抗癌	1	VEGF-HEK293	元胡	CMC-online-HPLC-ESI-IT-TOF-MS	四氢巴马汀、紫堇碱	[40]
	2	EGFR-HEK293	射干	CMC-online-HPLC-IT-TOF MS	次野鸢尾黄素	[41]
	3	PC-3	苦参	CMC-TOF-MS	槐果碱、苦参碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱、黄腐酚	[42]
	4	MCF7	元胡和白芷	APTES-CMC-Capcell-C ₁₈ -TOF-MS	氧青霉素、普罗平、小檗碱、异辛皮素、棕榈酸	[11]
	5	兔红细胞	人参次苷 H 滴丸	CMC/HPLC-MS/MS	人参皂苷 Rh ₂	[43]
	6	DUI45	大黄	APTES-CMC-HPLC-TOF-MS	大黄素、鼠李糖苷	[44]
	7	HepG2、L02	黄芩	APTES-CMC-C ₁₈ -TOF-MS	木犀草素、汉黄芩素、白杨素	[19]
	8	EGFR-HEK293	准噶尔乌头	CMC-HPLC-MS	乌头碱、12-表欧乌碱、准噶尔乌头碱	[45]
	9	EGFR-HEK293、FGFR4-HEK293	丹参	CMC-HPLC-ESI-IT-TOF-MS	丹参酸、丹参酮 I、丹参酮、隐丹参酮	[18]
	10	EGFR-HEK293	通关藤	CMC-HPLC-IT-TOF-MS	通关藤皂苷 G、通关藤皂苷 H、通关藤皂苷 I	[46]
	11	P-gp-MCF7	黄芩	APTES-CMC-Capcell-C ₁₈ -TOF-MS	黄芩苷	[12]
	12	GPC3-SK-Hep1	黄芩	CMC-C ₁₈ /TOF-MS	粘毛黄芩素 I	[47]
	13	EGFR-HEK293	前胡	SiO ₂ -GQDs-CMC-LC-IT-TOF	前紫杉醇 B	[8]
	14	EGFR-HEK293	大叶	SNAP-Tagged EGFR-CMCHPLC-IT-TOF-MS	木兰花碱	[14]
抗良性前列腺增生	15	α ₁ A-肾上腺素能受体细胞	五味子	CMC-UHPLC-MS	五味子甲素 A	[48]
	16	α ₁ A-肾上腺素能受体细胞	芸香果	CMC-offline-UHPLC-MS	脱氢吴茱萸碱	[49]
潜在过敏原	17	HMC-1	穿心莲	CMC-HPLC-ESI-MS	脱氢穿心莲内酯	[50]
	18	LAD2	野菊花	CMC-HPLC-IT-TOF-MS	蒙花苷	[51]
	19	MrgprX2-HEK293	苦碟子	CMC-HPLC-ESI-IT-TOF-MS。	木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷、木犀草苷、木犀草素	[52]
	20	MrgprX2-HEK293	丹参注射液	CMC-online-HPLC-ESI-MS	丹酚酸 A、丹酚酸 C、异丹酚酸 C	[53]
	21	IgE-R-RBL-2H3、MrgprX2-LAD2	哈青注射液	CMC-HPLC-ESI-IT-TOF-MS	华蟾素、胡椒碱、蛇床子素、紫杉醇 A、五味子甲素 A	[54]
	22	HMC-1	婴幼儿奶粉	CMC-MALDI-TOF-MS	α-酪蛋白、β-酪蛋白	[55]
	23	MrgprX2-HEK293、H1R-HEK293、RBL-2H3	参麦注射液	CMC-LC-MS	人参皂苷 Rb ₁ 、参皂苷 Rb ₂ 、人参皂甙 Re、人参皂苷 Rd、20-(S)-人参皂苷 Rg ₃	[56]
	24	MrgprX2-HEK293	参麦注射液	CMC-HPLC-IT-TOF-MS	人参皂苷 Rd、人参皂苷 Ro、人参皂苷 Rg ₃	[57]
	25	MrgprX2-HEK293	苍耳子	CMC-HPLC-ESI-IT-TOF-MS	噻嗪双酮苷	[58]
	26	MrgprX2-HEK293	皂角草	CMC/HPLC-ESI-IT-TOF-MS	升麻素苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷	[20]
27	MrgprX2-HEK293	望春花	CMC-LC-MS	辛夷脂素、松脂素二甲醚	[59]	
28	MrgprX2-HEK293	紫苏	CMC-HPLC-ESI-IT-TOF	芹菜素、迷迭香酸	[60]	
29	MrgprX2-HEK293	紫草	MrgX2-SNAP-tag-CMC-HPLC-ESI-MS	紫草素、乙酰紫草素	[16]	
保护骨骼	30	破骨细胞、成骨细胞	黄柏	mCMC-LC-TOF-MS	小檗碱、黄柏酸、黄柏碱、四氢巴马汀	[26]
	31	成骨细胞	六味地黄汤	PVA-PAD-CMC-UHPLC-TOF-MS	莫诺苷、梓醇、马钱素、醋栗苷	[6]
	32	BMMC	黄芩	MPTS-CMC-C ₁₈ -TOF-MS	叶黄素	[13]
保护心肌	33	H9C2	红曲米提取物	CMC-HPLC-QTOF-MS	莫纳可林、新黄色素	[21]
抗心脑血管疾病	34	HUVEC	葛根	CMC-LC-MS	葛根素、黄豆苷、葛根苷 D、3-羟基葛根素	[61]
抗糖尿病	35	MIN6	悬钩子	CMC-UPLC-TOF-MS	原花青素 B 二聚体、原花青素 C 三聚体	[62]
抗结晶性肾损伤	36	HK-2、HK-2/CIKI	光石韦	CMC-QTOF-MS	芒果苷	[63]
抗慢性肾小球肾炎	37	HBZY-1	益肾化湿颗粒	CMC-HPLC-Q-TOF-MS	毛蕊异黄酮苷、6-姜酚、柚皮苷、人参皂苷 Re、甘草素、异甘草素、柚木苷	[64]
抗新型冠状病毒感染	38	ACE2-HEK293	麻黄	CMC-HPLC-IT-TOF-MS	麻黄碱、伪麻黄碱、甲基麻黄碱	[65]
	39	ACE2-HEK293	黄芩	CMC	千层纸素	[66]
抗偏头痛	40	大鼠纹状体组织细胞	夏枯草	CMC-HPLC	熊果酸	[67]

3.3 相对标准法

由于药物与受体相互作用的 K_D 值并不是绝对值,不同方法得到的 K_D 值并不相同,因此通常只会比较具有相同膜受体的一类药物或化合物的 K_D 值。测定同种受体的药物的 K_D 值时,常规 FA 法需要对每一种化合物都进行分析,较长的清洗时间会缩短色谱柱寿命并浪费试剂资源。Ma 等^[85]

首次提出采用 CMC 相对标准法测定 K_D 值,该方法只需要从文献或者利用 FA 法获得一个化合物的 K_D 值,其余具有相同受体的化合物的 K_D 值可以依据该化合物的保留因子通过相对标准法的计算公式算出,此方法能够简化实验程序,减少时间和试剂的消耗。他们选取了 5 种血管紧张素 II 受体抑制剂:缬沙坦 (valsartan), 氯沙坦 (losartan), 奥美沙坦 (olme-

sartan),厄贝沙坦(irbesartan),替米沙坦(telmisartan)。首先通过放射配基结合分析法确定缬沙坦的 K_D 值,其他4种药物的 K_D 值通过相对标准法的公式换算得到。为了证明该方法的可靠性,其他4种药物的 K_D 值也通过前沿分析法测定了1次。2种方法得到的 K_D 值(表2)显示出很强的相关性(相关系数 r^2 为0.9972)。

表2 通过表皮生长因子受体(EGFR-CMC)模型获得的平衡解离常数(K_D)值^[85]

药物	K_D (相对标准法)/mol·L ⁻¹	K_D (前沿分析法)/mol·L ⁻¹
缬沙坦	1.44×10^{-9}	$(2.37 \pm 0.29) \times 10^{-6}$
氯沙坦	$(4.25 \pm 0.12) \times 10^{-10}$	$(1.07 \pm 0.28) \times 10^{-6}$
奥美沙坦	$(2.59 \pm 0.18) \times 10^{-10}$	$(8.04 \pm 0.33) \times 10^{-7}$
厄贝沙坦	$(2.48 \pm 0.22) \times 10^{-10}$	$(7.61 \pm 0.35) \times 10^{-7}$
替米沙坦	$(3.59 \pm 0.37) \times 10^{-11}$	$(4.52 \pm 0.29) \times 10^{-7}$

3.4 逐步前沿分析法

同样是为了在分析过程中尽量减少柱寿命损失和缩短测试时间,He等^[86]等首次在前沿分析的基础上发展了逐步前沿分析方法(stepwise frontal analysis,SFA)。在传统FA中,流动相中配体浓度的变化是独立的,不同浓度配体的穿透曲线互不干扰,每次分析后需要冲洗柱子然后分析下一个浓度的配体,而在SFA中,浓度的变化是连续的,不必在每个不同浓度的配体分析后冲洗柱子,从而节省了分析时间和试剂消耗。该团队在两个亲和色谱柱:HAS柱和AGP柱上进行了验证,结果显示良好的相关性($r^2=0.9946\sim 0.9998$),将得到的 K_D 值与文献值进行比较后显示出相同的数量级。此后该团队^[87]将SFA方法与CMC相结合,利用 α_{1A} -AR-HEK293/CMC模型,药物使用坦洛新(tamsulosin)、西洛多辛(sildenafil)和羟甲唑啉(oxymetazoline),通过SFA和FA研究了它们与CMC中 α_{1A} -AR受体的相互作用能力,受试药物通过SFA和FA方法得到的 K_D 值顺序相同。Wei等^[48]应用此方法,先从五味子提取物中筛选作用于 α_{1A} -AR的活性化合物五味子素A,随后利用SFA法得到五味子素A的 K_D 值为 $(10.6 \pm 0.13) \times 10^{-6}$ mol·L⁻¹,该值与通过化学计量位移模型得到的 K_D 值处于同一数量级。

综上,FA法是一种常规的用于研究药物与受体之间的亲和相互作用的方法,但实验过程对试剂的消耗量大,耗时长。相对标准法和SFA法在FA法的基础上进行了改进,优势在于减少了实验过程中试剂和时间的消耗。在使用场景上,FA法和SFA法适用于常规的药物与受体之间相互作用研究;相对标准法常用于测定具有相同膜受体的一类药物或化合物的 K_D 值;竞争置换法常用于分析不同药物是否具有相同的作用位点。

4 展望

CMC技术在药物筛选和分析领域取得了广泛的应用,已从多种中药中筛选出了相应的有效组分,同时也大量应用于配体与受体的 K_D 值的测定。从方法学的角度来看,在细胞

膜与载体的连接方面,对硅胶改性以获得更稳定和特异性的吸附效果,同时又能尽可能地维持细胞膜受体的活性是将来发展的趋势。在膜色谱配套设备方面,分析仪器将从单维发展到多维,进一步提高效率与准确性。从膜受体制备角度,在提高目标受体含量的同时,如何实现多靶点、高通量仍然需要探索。从生物膜种类来看,基于细胞膜色谱技术的原理,发展细胞器膜色谱筛选技术将是今后的研究重点之一,特别是线粒体膜色谱技术的发展可能具有巨大的发展和应用潜力。

REFERENCES

- [1] HUANG X, KONG L, LI X, *et al.* Strategy for analysis and screening of bioactive compounds in traditional Chinese medicines [J]. *J Chromatogr B*, 2004, 812(1): 71-84.
- [2] HE L C, GENG X D. Cell membrane chromatography-a new method for studying the drug-receptor interactions [J]. *New Prog Biomed Chromatogr*(生物医药色谱新进展), 1996, 3(1): 8-9.
- [3] MA W, WANG C, LIU R, *et al.* Advances in cell membrane chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2021, 1639: 461916. DOI: 10.1016/j.chroma.2021.461916.
- [4] 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.
- [5] WANG X Y, CHEN X F, GU Y Q, *et al.* Progress of cell membrane chromatography and its application in screening active ingredients of traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Anal Chem*(分析化学), 2018, 46(11): 1695-1702.
- [6] WU C, WANG N, XU P, *et al.* Preparation and application of polyvinyl alcohol-decorated cell membrane chromatography for screening anti-osteoporosis components from Liuwei Dihuang decoction-containing serum [J]. *J Sep Sci*, 2020, 43(11): 2105-2114.
- [7] WU C, XU P, WANG X, *et al.* In situ modification of silica with poly(vinyl alcohol) for normal-phase liquid chromatographic separation of bioactive compounds in traditional Chinese medicines [J]. *Anal Methods*, 2019, 11(28): 3590-3596.
- [8] ZHANG L, YI X, WANG S, *et al.* Construction of graphene quantum dots-decorated EGFR cell membrane chromatography for screening active components from Peucedanum praeruptorum Dunn [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2021, 413(7): 1917-1927.
- [9] CHENG C, LI S, THOMAS A, *et al.* Functional graphene nanomaterials based architectures: biointeractions, fabrications, and emerging biological applications [J]. *Chem Rev*, 2017, 117(3): 1826-1914.
- [10] DING X, CAO Y, YUAN 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.
- [11] WANG X Y, DING X, YUAN Y F, *et al.* Comprehensive two-dimensional APTES-decorated MCF7-cell membrane chromatographic system for characterizing potential anti-breast-cancer components from Yuanhu-Baizhi herbal medicine pair [J]. *J Food Drug Anal*, 2018, 26(2): 823-833.
- [12] LIU Y, WANG X, GU Y, *et al.* Covalent design of cell mem-

- brane stationary phase with enhanced stability for fast screening P-glycoprotein inhibitors [J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2020, 3(8): 5000-5006.
- [13] GU Y, CHEN X, WANG Y, *et al.* Development of 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPTS)-modified bone marrow mononuclear cell membrane chromatography for screening anti-osteoporosis components from *Scutellariae Radix* [J]. *Acta Pharm Sin B* (药理学报英文版), 2020, 10(10): 1856-1865.
- [14] FU J, JIA Q, LIANG P, *et al.* Targeting and covalently immobilizing the EGFR through SNAP-Tag technology for screening drug leads [J]. *Anal Chem*, 2021, 93(34): 11719-11728.
- [15] HUSSAIN A F, HEPPESTALL P A, KAMPMEIER F, *et al.* One-step site-specific antibody fragment auto-conjugation using SNAP-tag technology [J]. *Nat Protoc*, 2019, 14(11): 3101-3125.
- [16] JIA Q, FU J, GAO C, *et al.* MrgX2-SNAP-tag/cell membrane chromatography model coupled with liquid chromatography-mass spectrometry for anti-pseudo-allergic compound screening in *Arnebiae Radix* [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2022, 414(19): 5741-5753.
- [17] HOU X, YUAN X, ZHANG B, *et al.* Screening active anti-breast cancer compounds from *Cortex Magnolia officinalis* by 2D LC-MS [J]. *J Sep Sci*, 2013, 36(4): 706-712.
- [18] FU J, LV Y, JIA Q, *et al.* Dual-mixed/CMC model for screening target components from traditional Chinese medicines simultaneously acting on EGFR & FGFR4 receptors [J]. *Talanta*, 2019, 192:248-254.
- [19] GU Y, CHEN X, WANG R, *et al.* Comparative two-dimensional HepG2 and L02/ cell membrane chromatography/ C_{18} /time-of-flight mass spectrometry for screening selective anti-hepatoma components from *Scutellariae Radix* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 164:550-556.
- [20] JIA Q, SUN W, ZHANG L, *et al.* Screening the anti-allergic components in *Saposhnikoviae Radix* using high-expression Mas-related G protein-coupled receptor X2 cell membrane chromatography online coupled with liquid chromatography and mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2019, 42(14): 2351-2359.
- [21] LIU R Z, WANG R, AN H M, *et al.* A strategy for screening bioactive components from natural products based on two-dimensional cell membrane chromatography and component-knockout approach [J]. *J Chromatogr A*, 2019, 1601:171-177.
- [22] DING X, CHEN X, CAO Y, *et al.* Quality improvements of cell membrane chromatographic column [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1359:330-335.
- [23] TANG C, LIU Z-S, QIN N, *et al.* Novel cell membrane capillary chromatography for screening active compounds from natural products [J]. *Chromatographia*, 2013, 76(11): 697-701.
- [24] ZHANG F, ZHAO X, XU B, *et al.* Preparation and characterization of micro-cell membrane chromatographic column with silica-based porous layer open tubular capillary as cellular membrane carrier [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(10): 2441-2448.
- [25] XU L, XU B, ZHAO Z Y, *et al.* Preparation and characterization of micro-cell membrane chromatographic column with N-hydroxy-succinimide group-modified silica-based porous layer open tubular capillary [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1516:125-130.
- [26] WANG N, XU P, WU C, *et al.* Preparation of micro-cell membrane chromatographic columns with polyvinyl alcohol-modified polyether ether ketone tube as cellular membrane carrier [J]. *J Chromatogr B*, 2019, 1104:102-108.
- [27] GU Y, WANG R, CHEN P, *et al.* In situ synthesis and unidirectional insertion of membrane proteins in liposome-immobilized silica stationary phase for rapid preparation of microaffinity chromatography [J]. *Acta Pharm Sin B* (药理学报英文版), 2022, 12(9): 3682-3693.
- [28] CARLSON E D, GAN R, HODGMAN C E, *et al.* Cell-free protein synthesis: applications come of age [J]. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(5): 1185-1194.
- [29] LONG J G, LIU J K. Mitochondrial nutrients [J]. *Electron Metab Nutr Caner* (肿瘤代谢与营养电子杂志), 2016, 3(2): 71-76.
- [30] LIU J, AMES B N. Reducing mitochondrial decay with mitochondrial nutrients to delay and treat cognitive dysfunction, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease [J]. *Nutr Neurosci*, 2005, 8(2): 67-89.
- [31] BALLINGER S W. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease [J]. *Free Radicals Biol Med*, 2005, 38(10): 1278-1295.
- [32] FULDA S, GALLUZZI L, KROEMER G. Targeting mitochondria for cancer therapy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(6): 447-464.
- [33] LIU J, SHEN W, ZHAO B, *et al.* Targeting mitochondrial biogenesis for preventing and treating insulin resistance in diabetes and obesity: hope from natural mitochondrial nutrients [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(14): 1343-1352.
- [34] OLSZEWSKA A, SZEWCZYK A. Mitochondria as a pharmacological target: magnum overview [J]. *IUBMB Life*, 2013, 65(3): 273-281.
- [35] HABICHT K L, SINGH N S, INDIG F E, *et al.* The development of mitochondrial membrane affinity chromatography columns for the study of mitochondrial transmembrane proteins [J]. *Anal Biochem*, 2015, 484:154-161.
- [36] MOADDEL R, WAINER I W. The preparation and development of cellular membrane affinity chromatography columns [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(2): 197-205.
- [37] HABICHT K L, FRAZIER C, SINGH N, *et al.* The synthesis and characterization of a nuclear membrane affinity chromatography column for the study of human breast cancer resistant protein (BCRP) using nuclear membranes obtained from the LN-229 cells [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 72:159-162.
- [38] SINGH N S, HABICHT K L, MOADDEL R, *et al.* Development and characterization of mitochondrial membrane affinity chromatography columns derived from skeletal muscle and platelets for the study of mitochondrial transmembrane proteins [J]. *J Chromatogr B*, 2017, 1055/1056:144-148.
- [39] LIU J, XIAO H B. Research progress on pharmacodynamic substances of Chinese Medicine based on chromatographic techniques [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2019, 54(1): 73-81.
- [40] 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.
- [41] LV Y N, FU J, KONG L Y, *et al.* EGFR antagonism of the iriflorentin from *Rhizoma Belamcandae* using CMC-online-HPLC-IT-TOF MS system [J]. *J Chin Mass Spectr Soc* (质谱学报),

- 2017, 38(4): 425-432.
- [42] WANG Q, XU J, LI X, *et al.* Comprehensive two-dimensional PC-3 prostate cancer cell membrane chromatography for screening anti-tumor components from Radix Sophorae flavescentis [J]. *J Sep Sci*, 2017, 40(13): 2688-2693.
- [43] MA X W, YU M M, JIN X H, *et al.* Active ingredients screening by cell membrane chromatography and simultaneous quantitation of ginsenosides in bulk drug of secondary ginsenoside H dripping pills [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2018, 49(11): 2545-2550.
- [44] ZHENG L, CHEN S, CAO Y, *et al.* Combination of comprehensive two-dimensional prostate cancer cell membrane chromatographic system and network pharmacology for characterizing membrane binding active components from Radix et Rhizoma Rhei and their targets [J]. *J Chromatogr A*, 2018, 1564:145-154.
- [45] Siyiti M, LIN Y Y, ZHANG J, *et al.* Screening of anti-EGFR components from aconitum soongaricum stapf in Xinjiang province based on cell membrane chromatography [J]. *China Pharm*(中国药师), 2018, 21(5): 766-771.
- [46] LV Y, SHI X, FU J, *et al.* Screening potential antagonists of epidermal growth factor receptor from Marsdenia tenacissima via cell membrane chromatography model assisted by HPLC-ESI-IT-TOF-MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2019, 33(9): e4569. DOI: 10.1002/bmc.4569.
- [47] CHEN C, GU Y, WANG R, *et al.* Comparative two-dimensional GPC3 overexpressing SK-Hep1 cell membrane chromatography / C18/ time-of-flight mass spectrometry for screening selective GPC3 inhibitor components from Scutellariae Radix [J]. *J Chromatogr B*, 2021, 1163:122492. DOI: 10.1016/j.jchromb.2020.122492.
- [48] WEI F, HE X, XU K, *et al.* Stepwise frontal analysis coupled with cell membrane chromatography for affinity screening and characterization analysis of bioactive constituent from the mature fruits of schisandra chinensis [J]. *J Chromatogr B*, 2020, 1161:122443. DOI: 10.1016/j.jchromb.2020.122443.
- [49] HE X, XU X, SUI Y, *et al.* Screening of the active compound from Tetradium ruticarpum fruits and analysis of its binding characteristics to the α 1A adrenoceptor by high expression α 1A adrenoceptor cell membrane chromatography [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 195:113874. DOI 10.1016/j.jpba.2020.113874.
- [50] LIN Y, WANG C, HOU Y, *et al.* The human mast cell line-1 cell membrane chromatography coupled with HPLC-ESI-MS/MS method for screening potential anaphylactic components from chuanxinlian injection [J]. *Biomed Chromatogr*, 2017, 31(12): e4015. DOI: 10.1002/bmc.4015.
- [51] LV Y, FU J, SHI X, *et al.* Screening allergic components of Yezuhua injection using LAD2 cell membrane chromatography model online with high performance liquid chromatography-ion trap-time of flight-mass spectrum system [J]. *J Chromatogr B*, 2017, 1055-1056:119-124.
- [52] LIN Y, LV Y, FU J, *et al.* A high expression Mas-related G protein coupled receptor X2 cell membrane chromatography coupled with liquid chromatography and mass spectrometry method for screening potential anaphylactoid components in kudiezi injection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 159:483-489.
- [53] LIN Y, WANG C, HOU Y, *et al.* Simultaneous identification of three pseudoallergic components in Danshen injection by using high-expression Mas-related G protein coupled receptor X2 cell membrane chromatography coupled online to HPLC-ESI-MS/MS [J]. *J Sep Sci*, 2018, 41(11): 2488-2497.
- [54] HAN S, LV Y, KONG L, *et al.* Simultaneous identification of the anaphylactoid components from traditional Chinese medicine injections using rat basophilic leukemia 2H3 and laboratory of allergic disease 2 dual-mixed/cell membrane chromatography model [J]. *Electrophoresis*, 2018, 39(9-10): 1181-1189.
- [55] ZHANG P, SHI Y, HE X, *et al.* Study on screening potential allergenic proteins from infant milk powders based on human mast cell membrane chromatography and histamine release assays [J]. *J Pharm Anal*, 2019, 9(1): 55-61.
- [56] LIN Y, JIA Q, SUN W, *et al.* Multi targeted cell membrane chromatography: a comprehensive method for screening the anaphylactoid components from complex samples [J]. *Talanta*, 2020, 209:120539. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.120539.
- [57] SUN W, WANG S, LIANG P, *et al.* Pseudo-allergic compounds screened from Shengmai injection by using high-expression Mas-related G protein-coupled receptor X2 cell membrane chromatography online coupled with liquid chromatography and mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2021, 44(7): 1421-1429.
- [58] LIN Y Y, JIA Q Q, SUN W, *et al.* Cell membrane chromatography coupled with online HPLC-ESI-IT-TOF-MS system to screen anti-anaphylactoid components from Fructus Xanthii [J]. *Cent South Pharm*(中南药学), 2019, 17(9): 1397-1401.
- [59] 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.
- [60] 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]. *J Pharm Pharmacol*, 2020, 72(6): 852-862.
- [61] ZHANG Y N, ZHU S J, LI N, *et al.* Screening and identification of the active components from Puerariae Radix by HUVEC/CMC-LC-MS2 [J]. *J Chromatogr B*, 2019, 1132:121825. DOI: 10.1016/j.jchromb.2019.121825.
- [62] SUN M, ZHU T, TONG J, *et al.* Screening active components from Rubus amabilis for pancreatic beta-cells protection [J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 674-685.
- [63] PAN P, CHENG J, SI Y, *et al.* A stop-flow comprehensive two-dimensional HK-2 and HK-2/CIKI cell membrane chromatography comparative analysis system for screening the active ingredients from Pyrosia calvata (Bak.) Ching against crystal-induced kidney injury [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 195:113825. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113825.
- [64] YUEN-CHEUNG C, JING Z, QIN H, *et al.* Chemical profile assessment and potential bioactive component screening of a Chinese patent herbal drug Yi-Shen-Hua-Shi Granule [J]. *Nat Prod Commun*, 2021, 16(6): 1934-578X. DOI: 10.1177/1934578X211021691.
- [65] LÜ Y, WANG S, LIANG P, *et al.* Screening and evaluation of anti-SARS-CoV-2 components from Ephedra sinica by ACE2/CMC-HPLC-IT-TOF-MS approach [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2021, 413(11): 2995-3004.
- [66] GAO J, DING Y, WANG Y, *et al.* Oroxylin A is a severe acute

- respiratory syndrome coronavirus 2-spiked pseudotyped virus blocker obtained from Radix Scutellariae using angiotensin-converting enzyme II/cell membrane chromatography [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(6): 3194-3204.
- [67] DU H, YANG H G, LI J J. Screening of active components in *Prunella vulgaris* for migraine [J]. *Cent South Pharm*(中 南 药 学), 2017, 15(10): 1364-1367.
- [68] MA W, YANG L, HE L. Overview of the detection methods for equilibrium dissociation constant KD of drug-receptor interaction [J]. *J Pharm Anal*, 2018, 8(3): 147-152.
- [69] ZHANG J, WU J, TOYOHARA J, *et al.* Pharmacological characterization of [³H]CHIBA-3007 binding to glycine transporter 1 in the rat brain [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21322.
- [70] VACHALI P P, LI B, BARTSCHI A, *et al.* Surface plasmon resonance (SPR)-based biosensor technology for the quantitative characterization of protein-carotenoid interactions [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2015, 572:66-72.
- [71] LOHSE M J, NUBER S, HOFFMANN C. Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study G-protein-coupled receptor activation and signaling [J]. *Pharmacol Rev*, 2012, 64(2): 299. DOI: 10.1124/pr.110.004309.
- [72] DI TRANI J M, DE CESCO S, O'LEARY R, *et al.* Rapid measurement of inhibitor binding kinetics by isothermal titration calorimetry [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 893. DOI: 10.1038/s41467-018-03263-3.
- [73] WIENKEN C J, BAASKE P, ROTHBAUER U, *et al.* Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis [J]. *Nat Commun*, 2010, 1(1): 100. DOI: 10.1038/ncomms1093.
- [74] ART J F, VANDER STRAETEN A, DUPONT-GILLAIN C C. Immobilization of aluminum hydroxide particles on quartz crystal microbalance sensors to elucidate antigen-adjuvant interaction mechanisms in vaccines [J]. *Anal Chem*, 2018, 90(2): 1168-1176.
- [75] HAN S, LV Y, WEI F, *et al.* Screening of bioactive components from traditional Chinese medicines using cell membrane chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *Phytochem Anal*, 2018, 29(4): 341-350.
- [76] MA L, LI J, ZHAO J, *et al.* Penetrable silica microspheres for immobilization of bovine serum albumin and their application to the study of the interaction between imatinib mesylate and protein by frontal affinity chromatography [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(3): 805-814.
- [77] Enzymatic activity and chromatographic characteristics of the cell membrane immobilized on silica surface [J]. *Chin Sci Bull*(科学通报), 1999, 44(9): 826-831.
- [78] HOU X F, DU H, HE X S, *et al.* Advances in research on the application of cell membrane chromatography in the study of drug-receptor interactions [J]. *Prog Pharm Sci*(药 学 进 展), 2015, 39(12): 882-888.
- [79] ZENG A, YUAN B, WANG C, *et al.* Frontal analysis of cell-membrane chromatography for determination of drug- α 1D adrenergic receptor affinity [J]. *J Chromatogr B*, 2009, 877(20): 1833-1837.
- [80] DU H, HE J, WANG S, *et al.* Investigation of calcium antagonist-L-type calcium channel interactions by a vascular smooth muscle cell membrane chromatography method [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397(5): 1947-1953.
- [81] WEI F, WANG S, LÜ N, *et al.* Characterization the affinity of α 1A adrenoceptor by cell membrane chromatography with frontal analysis and stoichiometric displacement model [J]. *J Chromatogr B*, 2017, 1040:273-281.
- [82] DU H, REN J, WANG S, *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.
- [83] YANG L, ZHU M, KANG 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. DOI: 10.1002/jmr.2701.
- [84] YANG L, ZENG Y, MA N, *et al.* Interaction of taspine derivative TPD7 with vascular endothelial growth factor receptor 2 by cell membrane chromatography [J]. *Chromatographia*, 2019, 82(12): 1741-1748.
- [85] MA W, YANG L, LÜ Y, *et al.* Determine equilibrium dissociation constant of drug-membrane receptor affinity using the cell membrane chromatography relative standard method [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1503:12-20.
- [86] HE X, SUI Y, WANG S. Stepwise frontal affinity chromatography model for drug and protein interaction [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(23): 5807-5815.
- [87] HE X, SUI Y, WANG S. Application of a stepwise frontal analysis method in cell membrane chromatography [J]. *J Chromatogr B*, 2020, 1161: 122436. DOI: 10.1016/j.jchromb.2020.122436.

(收稿日期:2023-04-11)