白细胞膜色谱模型建立与白术中TLR$_4$受体拮抗活性成分筛选研究

李翠芹 贺浪冲*

(西安交通大学医学院, 西安 710061)

摘要 筛选发现白术中能够作用于TLR$_4$受体并具有抑制炎症反应的活性成分. 用硅胶为载体, 制备兔白细胞膜色谱固定相, 建立白细胞膜色谱模型; 以紫杉醇为模型分子, 筛选白术中作用于白细胞膜及膜受体(如TLR$_4$)的活性成分, 通过置换实验确定活性成分可能的作用靶点; 用整体药理实验验证活性成分的抗炎作用. 结果发现: 白术中白术内酯 I 具有与紫杉醇类似的保留特性, 作用于白细胞膜及TLR$_4$受体, 其较强的抗炎活性与拮抗TLR$_4$受体有关. 所以, 本文所建立的白细胞膜色谱模型可以在体外模拟活性成分与白细胞膜及膜受体相互作用, 可用于特定靶标的作用成分和作用特性筛选研究.

关键词 白细胞膜色谱 TLR$_4$受体 白术内酯 I 抗炎作用

炎症是一种常见而又重要的病理过程. 炎症反应是以血管反应为中心, 以白细胞的激活为特征的. 近年来, 对炎症反应及抗炎机制的研究中发现, 在炎症反应过程中发挥重要作用的不仅有炎症反应相关酶、炎症介质、细胞因子与细胞黏附分子等, 还涉及核转录因子κB和Toll信号转导通路[1,2]. 1991 年, Gay等人[3]发现了果蝇属Toll受体(一类跨膜受体蛋白); 1996 年, Lemaitre等人[4]证实Toll受体可介导对细菌及真菌感染免疫; 1997 年, Medzhitov等人[5]首次发现人体内存在与Toll同源的hToll, 命名为TLR$_4$. 迄今的研究表明, 病原识别模式分子(PAMPs)与TLRs结合, 最终导致核转录因子κB(NF-κB)的激活, 进而促进炎症反应中起重要作用的多种基因的表达. 因此, 以TLR$_4$为靶标, 阻断TLR$_4$的功能即能抑制炎症反应的发生[6]. 2000 年, Kawasaki等人[7]发现紫杉醇能够与TLR$_4$直接作用.

研究表明白细胞膜上富含有TLR$_4$跨膜受体蛋白质. 通常, 研究药物小分子与膜受体相互作用特性的经典方法为放射性配体结合实验(radioligand binding assay, RBA)[8], 袁秉祥等人[9~12]证实细胞膜色谱法(cell membrane chromatography, CMC)可用于药物与膜受体相互作用特性研究, 并与RBA法的结果显著相关. 本文利用CMC技术[13~15]建立白细胞膜色谱模型, 以紫杉醇为模型分子, 筛选白术中与白细胞膜及

2005-04-27 收稿, 2005-08-29 收修改稿
* 联系人, E-mail: helc@mail.xitu.edu.cn

TLR_4受体作用的活性成分，研究其作用特性，并对其抗炎活性进行实验验证.

1 实验

1.1 材料与试药

色谱分析系统包括 SPECTRA SERIE P200 色谱泵和 SPECTRA 100 紫外检测器(Thermo Separation Products, 美国), 7125 型手动进样阀(Rheodyne 公司, 美国)和 ANASTAR 色谱工作站(奥泰科技有限公司, 天津); HERMLE ZK-401 型低温冷冻高速离心机(德国); Philips XL series XL20 型扫描电子显微镜; EDAX DX-4 能谱仪(荷兰).

紫杉醇(西安交大保赛生物技术股份有限公司, 纯度: >98%); LPS(lipopolysaccharide, 来自*E. coli* serotype 0111: B4)(Sigma公司, 美国); 三磷酸腺苷二钠盐($ATPNa_2$), 苯甲基磺酰氟(PMSF), Dextran T_{500}和Tris碱(华美生物工程公司); 磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)、乙二胺四乙酸二钠($EDTANa_2$)、氯化钠(NaCI)、氯化钾(KCI)、盐酸(HCI)和磷酸(H_3PO_4)等均为分析纯(西安化学试剂厂); 色谱纯甲醇(Fisher公司, 美国); 柱层析硅胶(青岛海洋化工厂分厂); 蛋白质测定试剂盒(南京建成生物工程研究所); 白术饮片(市售)经西安交通大学药学院生药教研室鉴定为正品药材.

健康家兔, 雌雄不限, 体重 2~2.5 kg, 昆明种雄性小白鼠, 体重 18~22 g, 均由西安交通大学医学实验动物中心提供. 大孔球形硅胶(粒度 3~5 μm, 孔径 100 Å), 中国科学院化学研究所提供. C_{18}硅胶(粒径 200~300 μm), 西安交大保赛生物技术股份有限公司提供.

1.2 细胞膜色谱模型建立

(1) 细胞膜制备: 兔白细胞膜和红细胞膜照文献[16]方法制备, 家兔自颈动脉取血, 肝素抗凝, 加入等体积 3% Dextran T_{500}生理盐水溶液混匀, 将试管直立室温静置 30~60 min; 待形成清晰红细胞界面时, 将红细胞层和血浆层分别移入离心管中, 分别先以 650× *g*, 4℃离心 10 min, 弃上层血浆; 加入生理盐水, 以 650× *g*, 4℃离心 5 min, 洗涤 3 次; 加入细胞 30 倍体积的破膜液, 超声破膜 5 min, 15000× *g*离心 10 min, 弃上清液; 沉淀中加入 10 mL的破膜液, 振荡, 同样条件离心洗涤, 即得红细胞膜. 白细胞破膜后, 先用 10000× *g*离心除去细胞核等, 再用 15000× *g*离心得白细胞膜. 测定细胞膜的蛋白质含量和总ATP酶活性后, –20℃保存备用.

(2) 细胞膜固定相制备: 照文献[13~15]方法制备白细胞膜和红细胞膜固定相. 在 250 mL烧杯中加入 5.0 g大孔球形硅胶, 混悬于 1.0 mo1/L盐酸溶液 100 mL, 超声处理 15 min, 然后将其转移至 250 mL 三颈瓶中, 在搅拌下回流 2 h. 反应完毕后将混悬液转移至 1000 mL烧杯中, 加 800 mL蒸馏水并搅拌使其呈混悬状, 静置, 倾去上清液, 重复此操作 4 次. 最后用G4 玻璃坩锅抽干, 于 120℃活化 7 h, 作为制备细胞膜固定相的载体, 备用.

取经活化处理硅胶 0.3 g, 作为细胞膜的载体置于低温反应管中, 在抽真空和震荡条件下, 分别加入白细胞膜悬液和红细胞膜悬液 5 mL(一般膜蛋白质浓度不低于 2.0 mg/mL), 反应 1 h 后, 加入 5 mL 生理盐水稀释, 在 25℃条件下, 使细胞膜磷脂双层自融合, 直至在硅胶载体表面形成均匀的细胞膜. 低速离心除去上清液, 沉淀用 Tris-HCl 缓冲溶液洗涤, 除去未结合的细胞膜, 得到细胞膜固定相.

(3) 细胞膜固定相特性分析: 用扫描电子显微镜和能谱分析法[14], 测试细胞膜固定相的表面特性; 用Lowry法[17]分析细胞膜固定相的膜蛋白质含量; 用酶催化反应法[16]测定细胞膜固定相总ATP酶活性; 并以膜蛋白质含量为指标考察细胞膜固定相在色谱柱中的稳定性.

(4) 色谱条件: 细胞膜固定相色谱柱(10 mm×2 mm ID), 流速: 0.2 mL/min, 检测波长: 210~240 nm, 柱温: 37℃, 用流动相 5 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH=7.4)平衡约 2 h 后, 开始进样分析.

1.3 分析样品制备

(1) 白术超临界提取部位: 取白术饮片, 粉碎, 过 60 目筛, 称取药粉 2 kg, 置于 5 L超临界萃取釜中. 开启制冷装置、萃取釜和分离釜加温装置, 待达到设定温度后打开压缩泵, 使萃取釜压力保持为 20.0 MPa, 温度为 50℃, 以 40 kg/h的CO_2流速循环萃取.

分离釜压力和温度分别为 10.0 MPa和 30℃, 循环提取 3 h. 得到黄色油状物, 提取率为 2.5%, 作为白术超临界提取部位(BZC).

(2) 白术分离部位: 取 BZC 50 g, 加乙醚溶解, 用 65 g 硅胶吸附, 室温下挥去乙醚. 取约 300 g 硅胶干法装柱(600 mm×100 mm), 加样于柱上端, 分别用石油醚、石油醚-乙醚(1:1)、乙醚和甲醇依次自流洗脱, 分别收集洗脱液, 减压回收洗脱液溶剂, 得到 BZC 的 4 种不同分离部位, 分别记作 BZC-1, BZC-2, BZC-3 和 BZC-4.

(3) 白术内酯Ⅰ: 取BZC-2 10 g, 加甲醇溶解, 用 15 g硅胶吸附, 室温下挥去甲醇. 取约 100 g C_{18}硅胶湿法装柱(600 mm×30 mm), 加样于柱上端, 用 60%~65%甲醇加压洗脱, 高效液相色谱检测, 色谱条件: ODS色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流速: 1.0 mL/min, 检测波长: 220 nm, 柱温: 室温, 流动相: 甲醇-水(67:33). 合并白术内酯Ⅰ流分, 回收甲醇, 乙醚萃取, 回收乙醚后得一白色固体, 用石油醚-乙醚(1:1)反复重结晶得白色针状结晶. 其熔点为: mp 121~123℃; IR_{max}(KBr)·cm^{-1}: 1750, 1680(丁烯酸内酯), 1648, 900(双键). MS m/z: 232(M^+), 217, 204, 161, 147, 133, 122, 107. ^{1}H-NMR($CDCl_3$, TMS内标)δ(10^6): 0.90, 1.13, 1.33, 1.57, 1.60~1.66, 1.82, 1.87, 1.98, 2.31, 2.37, 2.38, 2.73, 4.61, 4.83, 4.87. ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, TMS内标)δ(10^6): 40.8, 22.3, 36.3, 148.4, 49.9, 25.7, 162.5, 77.9, 47.5, 36.9, 120.1, 174.6, 8.2, 16.4, 106.9. 以上数据与文献[18]报道的白术内酯Ⅰ的数据一致,故该化合物确定为白术内酯Ⅰ.

1.4　抗炎活性测定

(1) 二甲苯致小鼠耳廓肿实验: 取健康雄性昆明种小鼠 50 只, 体重 18~22 g, 随机分为白术内酯Ⅰ高、中、低剂量组, 模型对照组(0.5%吐温 80 生理盐水溶液), 阳性对照组(阿司匹林 0.2 g/kg), 每组动物灌胃给药 3 天. 末次给药后 1 h, 将 20 μL 二甲苯涂于小鼠右耳廓两面致炎, 左耳作为对照, 致炎后 2 h 断颈处死动物, 沿耳廓基线剪下两耳, 用直径 9 mm 的打孔器分别在同一部位打下耳片称重, 计算各组肿胀度.

(2) 醋酸致小鼠腹膜炎实验: 取健康雄性昆明种小鼠 50 只, 体重 18~22 g, 随机分为白术内酯Ⅰ高、中、低剂量组, 模型对照组(0.5%吐温 80 生理盐水溶液), 阳性对照组(阿司匹林 0.2 g/kg), 灌胃给药 3 天. 末次给药后 1 h, 尾静脉注射 1%依文思蓝(Evans blue)生理盐水溶液 0.1 mL/10 g, 同时腹腔注射 0.9%醋酸溶液 0.1 mL/10 g, 20 min 后处死, 剪开腹腔, 用 5 mL 生理盐水分 5 次洗涤腹腔, 收集冲洗液. 1000× g 离心 15 min, 取上清液于 590 nm 处测定吸收值, 计算洗液中依文思蓝浓度.

2　结果与讨论

2.1　白细胞膜色谱模型的生物色谱特性

(1) 白细胞膜固定相的表面特性: 图 1(a)和(b)分别为用电子显微镜放大 5000 倍后观察到的纯硅胶载体和白细胞膜固定相的扫描电镜图像. 由图 1 可见, 与纯硅胶载体不同, 白细胞膜固定相中细胞膜已完全覆盖在硅胶表面并与硅胶连为一体. 因此, 在上述实验条件下, 白细胞膜已不可逆地吸附于硅胶载体表面, 硅胶表面完全被细胞膜覆盖后形成了细胞膜固定相.

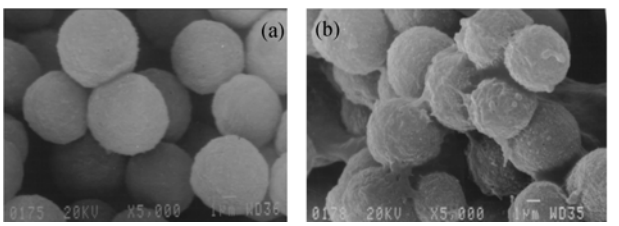

图 1　硅胶载体和硅胶载体细胞膜扫描电镜图像
(a) 硅胶载体(放大 5000 倍); (b) 硅胶载体细胞膜(放大 5000 倍)

图 2(a)和(b)分别为纯硅胶载体和白细胞膜固定相的表面能谱分析图. 从图中看出, 纯硅胶载体和白细胞膜固定相的元素组成完全不同, 铂(Pt)为样品制片时喷涂的铂金. 这进一步证实了在上述实验条件下制备的白细胞膜固定相表面完全被细胞膜覆盖, 白细胞膜固定相将表现出细胞膜的特性.

(2) 白细胞膜固定相的酶活性及稳定性: 取兔白细胞膜悬液, 等体积分为 3 份, 分别用作悬液细胞膜、离心取沉淀细胞膜和制备白细胞膜固定相, 用

Lowry法测定膜蛋白质含量后，分别考察在–196℃，–10℃，4℃及 25℃的条件下，放置 0, 12, 24, 48, 72 和 96 h后，其总ATP酶活性的变化趋势(图 3)，同时，计算其稳定性参数$t_{0.9}$(表 1). 结果表明，白细胞膜固定相与其他两种细胞膜制剂具有类似的酶活性变化特征，而且在较宽的温度和一定的时间范围内保持稳定. 因此，白细胞膜固定相具备一般膜制剂的性质.

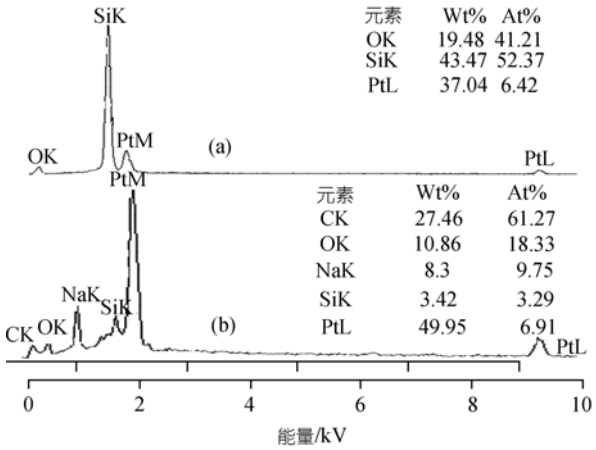

图 2 硅胶载体和硅胶载体细胞膜能谱表面分析图

(a) 硅胶载体; (b) 硅胶载体细胞膜

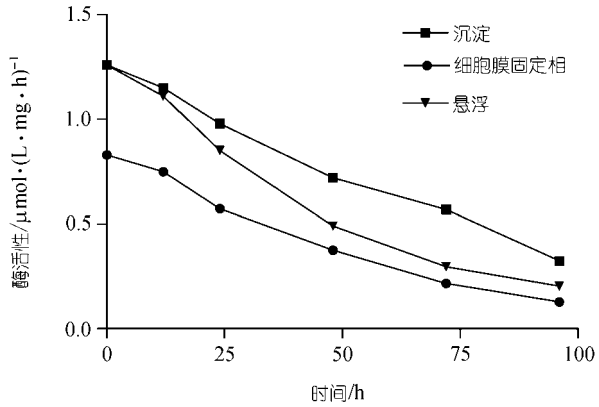

图 3 三种不同状态的兔白细胞膜在–10℃储存时酶活性随时间的变化规律

取出使用 3 天后的填充白细胞膜固定相，按柱前、柱后顺序等重量分为两份，分别测定其蛋白质含量，连续测定 5 根色谱柱，柱前膜蛋白量为(38.5±3.0) mg/g，柱后膜蛋白量为(36.3±3.8)mg/g，经 t 检验，柱前、后白细胞膜固定相蛋白质含量无显著性差异. 结果表明，经使用过程中流动相的冲洗，硅胶载体上的细胞膜仍均匀分布，没有脱落而被冲到柱子的另一端，其上的细胞膜稳定，不易流失.

表 1 3 种不同状态细胞膜的稳定性

膜制剂	$t_{0.9}$/ h [a)]			
	–196℃	–10℃	4℃	25℃
悬液细胞膜	14.47	10.11	5.40	3.34
沉淀细胞膜	38.73	13.99	8.80	5.86
白细胞膜固定相	19.76	12.30	6.75	5.29

a) $t_{0.9}$表示酶活性降低 10%时所需要的时间

(3) 白细胞膜固定相的色谱分离特性：由于其生物学特性，白细胞膜固定相将具有特殊的亲和色谱特性，能够选择性地分离与白细胞膜相互作用的药物分子或成分，同其他色谱方法一样，其作用强度可以用溶质容量因子 k'来表示. 在相同色谱条件下，测定了紫杉醇分别在纯硅胶固定相、白细胞膜固定相和红细胞膜固定相上的容量因子 k'. 结果：在以硅胶载体为固定相的色谱系统中，紫杉醇几乎不保留、容量因子 k'是 0.20，表明紫杉醇与硅胶固定相几乎无作用；在以红细胞膜为固定相的色谱系统中，紫杉醇也几乎不保留，容量因子 k'是 0.21，表明紫杉醇与红细胞膜及膜受体几乎无作用；而在以白细胞膜为固定相的色谱系统中，紫杉醇的保留时间明显增长，容量因子 k'是 8.98，由此证明白细胞膜对紫杉醇的保留起着支配作用，反映了紫杉醇与白细胞膜及膜受体间相互作用的特异性.

由于白细胞膜和红细胞膜上的受体蛋白质组成不同，白细胞膜上富含有TLR_4受体而红细胞膜上没有TLR_4受体，而且紫杉醇能够直接作用于TLR_4受体，因此，紫杉醇在两种色谱系统中有着完全不同的色谱保留行为. 利用以白细胞膜为固定相的色谱筛选模型，以紫杉醇为模型分子，能够筛选中药复杂体系中作用于白细胞膜及膜受体(如TLR_4)的活性成分.

2.2 白细胞膜色谱模型的生物识别特性

(1) 白术活性成分的筛选：以紫杉醇为对照，分别吸取各分析样品 BZC，BZC-1~BZC-4 和白术内酯Ⅰ溶液各 5 μL，注入白细胞膜固定相色谱柱分析，结

果 BZC-2 在白细胞膜固定相上有保留, 其他分离部位均无保留, 表明 BZC-2 中含有与白细胞膜及膜受体作用的活性成分. 经进一步的筛选分析表明BZC-2中的白术内酯Ⅰ是作用于白细胞膜及膜受体的活性成分(图 4).

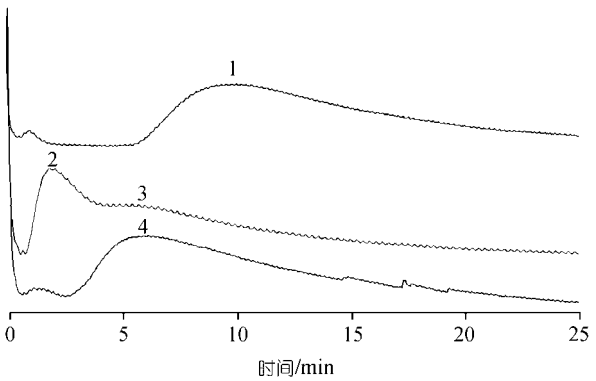

图 4　紫杉醇和白术样品在白细胞膜固定相上的色谱图
1 示紫杉醇; 2 和 3 示 BZC-2 样品中的 2 个保留组分; 4 示白术内酯Ⅰ. 色谱条件: 白细胞膜固定相色谱柱(10 mm×2 mm ID), 流速: 0.2 mL/min, 检测波长: 210~240 nm, 柱温: 37℃, 流动相: 5 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH=7.4)

(2) 白术内酯Ⅰ与TLR_4受体的作用: 用置换实验法考察白术内酯Ⅰ与TLR_4受体的作用. 将LPS添加到 5 mmol/L磷酸盐缓冲溶液(pH=7.4)中, 配成不同浓度的LPS溶液作为流动相. 待色谱系统平衡后, 分别测定不同LPS浓度(C)下紫杉醇和白术内酯Ⅰ的容量因子(k'), 并绘制logk'-C置换曲线(图 5). 结果表明随LPS浓度的增加, 紫杉醇和白术内酯Ⅰ的logk'值降低, 表明紫杉醇和白术内酯Ⅰ与白细胞膜上TLR_4受体的结合能够被LPS所置换, TLR_4受体应该是它们共同的作用靶点. 这一实验结果将从另一个角度证实: 紫杉醇和LPS均能够与TLR_4受体特异性结合, 且两者具有竞争性.

将紫杉醇或白术内酯Ⅰ分别添加到 5 mmol/L磷酸盐缓冲溶液(pH=7.4)中, 配成不同浓度的紫杉醇或白术内酯Ⅰ溶液作为流动相, 待色谱系统平衡后, 分别测定不同浓度(C)下白术内酯Ⅰ或紫杉醇的容量因子(k'), 绘制logk'-C置换曲线(图 6). 结果随着紫杉醇浓度的增加, 白术内酯Ⅰ的logk'值降低; 同样随着白术内酯Ⅰ浓度的增加, 紫杉醇的logk'值也降低, 此结果表明它们有部分相同的作用部位, 白术内酯Ⅰ的作用靶点可能是TLR_4受体.

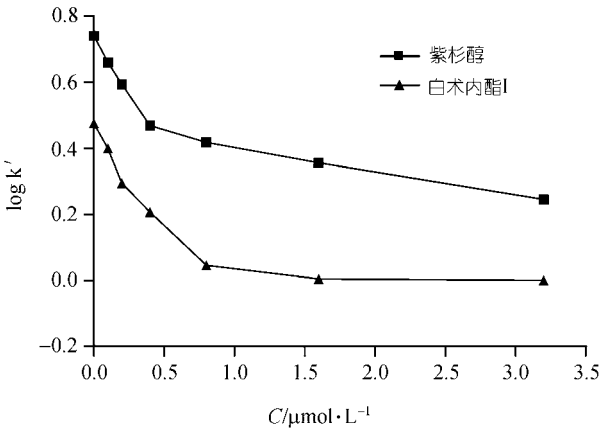

图 5　LPS 对紫杉醇和白术内酯Ⅰ色谱保留特性的影响
logk'为紫杉醇或白术内酯Ⅰ的容量因子对数值

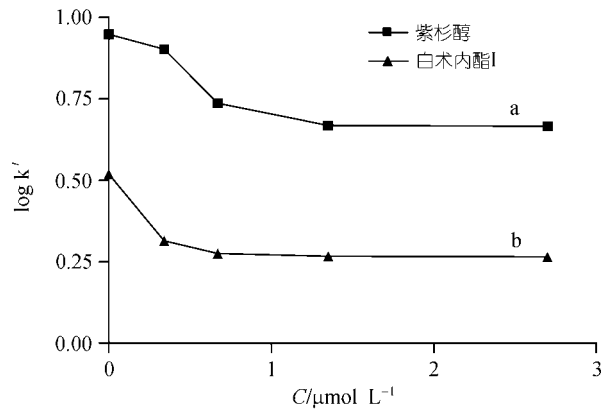

图 6　紫杉醇与白术内酯Ⅰ的置换实验
1 示白术内酯Ⅰ为置换剂; 2 示紫杉醇为置换剂. logk'为紫杉醇或白术内酯Ⅰ的容量因子对数值

当紫杉醇浓度大于 0.67 μmol/L 时, 白术内酯Ⅰ的 logk'值基本保持不变; 当白术内酯Ⅰ浓度大于 1.30 μmol/L 时, 紫杉醇的 logk'值基本保持不变, 表明药物分子竞争吸附已达到动态平衡.

2.3　白术内酯Ⅰ的抗炎作用

白术内酯Ⅰ对小鼠耳廓炎症的影响结果(表 2)表明, 白术内酯Ⅰ高剂量组能显著减轻二甲苯所致小鼠耳廓的炎性肿胀度. 白术内酯Ⅰ对小鼠腹膜炎的

影响结果(表 3)表明, 白术内酯 I 高剂量组能显著降低醋酸所致的小鼠腹腔毛细血管通透性的增加. 以上炎症反应验证, 白术内酯 I 具有较强的抗炎作用. 1998 年Marion等人[19]发现白术内酯 I 对 5-脂氧酶和环加氧酶-1 没有抑制作用, 说明其不是通过该途径具有抗炎作用. 白术内酯 I 在白细胞膜色谱模型上与紫杉醇有部分相同的作用部位, 并且能够被LPS拮抗, 其作用靶点可能是TLR_4受体, 因此, 它可能通过拮抗TLR_4的活性而具有抗炎作用.

表 2 白术内酯 I 对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	剂量/mg·kg^{-1}	动物数/只	肿胀度/mg
模型组	–	10	20.5 ± 4.9
阿司匹林组	200	10	14.8 ± 4.1[a)]
低剂量组	30	10	18.8 ± 6.0
中剂量组	100	10	17.5 ± 2.1
高剂量组	300	10	14.9 ± 4.0[a)]

a) 与模型组比较, P<0.05

表 3 白术内酯 I 对小鼠腹腔毛细血管通透性亢进的影响($\bar{x}$ ± s, n = 10)

组别	剂量/mg·kg^{-1}	动物数/只	依蓝浓度/μg·L^{-1}
模型组	–	10	12.93 ± 2.37
阿司匹林组	200	10	6.06 ± 1.84[a)]
低剂量组	30	10	12.93 ± 5.01
中剂量组	100	10	10.82 ± 3.95
高剂量组	300	10	9.75 ± 2.89[b)]

与模型组比较 a) P<0.01; b) P<0.05

3 结论

白细胞膜色谱模型具有白细胞膜制剂的生物活性和色谱分离的“双重”特性, 可以在体外模拟活性成分与白细胞膜及膜受体的相互作用. 与硅胶载体和红细胞膜为固定相的色谱系统不同, 白细胞膜为固定相的色谱系统能够特异性地分离直接作用于TLR_4受体的紫杉醇. 白术中白术内酯 I 具有与紫杉醇类似的保留特性, 而且紫杉醇和白术内酯 I 与白细胞膜固定相的结合能够被LPS所拮抗, 因此白术内酯 I 是白术中作用于白细胞膜及膜受体(如TLR_4)的活性成分; 经炎症反应验证, 白术内酯 I 具有较强的抗炎作用, 说明白术内酯 I 是TLR_4受体的拮抗剂. 在设有特定的对照分子条件下, 本文所建立的白细胞膜色谱模型可用于研究药物分子或活性分子与靶体(如膜受体)的相互作用特性, 结果只表明其能够与靶标作用, 至于作用后产生何种生物效应, 需要进一步的离体或整体药理实验验证. 同时可用于从复杂体系(如中药)中筛选发现与特定靶体作用的活性成分, 其筛选结果与药理作用具有显著的相关性.

参 考 文 献

1 Aderem A, Ulevitch R J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. Nature, 2000, 406(6797): 782~787 [DOI]
2 Vogel G. Fly development genes lead to immune find. Science, 1998, 281: 1942~1944 [DOI]
3 Gay N J, Keith F J. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. Nature, 1991, 351: 355~356
4 Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. Cell, 1996, 86(6): 973~983 [DOI]
5 Medzhitov R, Preston H P, Janeway C A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature, 1997, 388: 394~397 [DOI]
6 O'Neill L A. Therapeutic targeting of Toll-like receptors for inflammatory and infectious diseases. Curr Opin Pharmacol, 2003, 3(4): 396~403 [DOI]
7 Kawasaki K, Akashi S, Shimazu R, et al. Mouse Toll-like Receptor 4·MD-2 Complex Mediates Lipopolysaccharide-mimetic Signal Transduction by Taxol. J Bio Chem, 2000, 275(4): 2251~2254 [DOI]
8 Paton W D M, Rang H P. The uptake of atropine and related drugs by intestinal smooth muscle of the guinea-pig in relation to acetylcholine receptors. Proc Roy Soc, Ser B, 1965, 163: 1~44
9 张 典, 袁秉祥, 邓秀玲, 杨广德, 贺浪冲, 张幼怡, 韩启德. 用α1D 受体高表达细胞膜色谱研究 9 种配体的生物亲和作用. 中国科学, C 辑, 2004, 34(2): 173~177
10 Hou J, Yuan B X, He L C, et al. Evaluation of drug-muscarinic receptor affinities by using cell membrane chromatography. Chin J Pharmacol Toxicol, 2003, 17(1): 70~73
11 Wang Y, Yuan B X, Deng X L, et al. The preparation of HEK293 1A or 1B cell membrane stationary phase and the chromatography affinity study of ligands of α1-adrenoceptor. Anal Biochem, 2005, 339: 198~205 [DOI]
12 Yuan B X, Hou J, He L C, et al. Evaluation of drug-muscarinic receptor affinities using cell membrane chromatography and radioligand binding assay in guinea pig jejunum membrane. Acta Pharmacologica Sinica, 2005, 26(1): 113~116 [DOI]
13 贺冲浪, 耿信笃. 细胞膜色谱-研究药物与受体的新方法. 生物医药色谱新近展, 1996, 3: 8~9
14 贺浪冲, 杨广德, 耿信笃. 固定在硅胶表面细胞膜的酶活性及其色谱特性. 科学通报, 44(6): 632~637.
15 He L C, Wang S C, Geng X D. Coating and fusing cell membrane onto a silica surface and their chromatographic characteristics. Chromatographia, 2001, 54: 71~76
16 徐叔云, 卞如濂, 陈 修, 主编. 药理实验方法学. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 393~394; 521~523; 1244
17 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Bio Chem, 1951, 193: 265~276
18 黄宝山, 孙建枢, 陈仲良.白术内酯Ⅵ的分离鉴定. 植物学报, 1992, 34(8): 614~617
19 Marion R, Alois S, Chen Z L, et al. 5-Lipoxygenase and cyclooxygenase-1 inhibitory active compounds from *Atractylodes lancea*. J Nat Prod, 1998, 61(3): 347~350 [DOI]