

一种提高细胞膜色谱精确性和灵敏性的方法

王 瑜, 邓秀玲, 袁秉祥, 贺浪冲(西安交通大学医学院, 陕西 西安 710061)

摘要:目的 改进细胞膜色谱模型, 提高细胞膜色谱法的精确性和灵敏性, 评价此法用于亚型受体研究的科学性和可行性。方法 质粒转染得稳定高表达 HEK293 α_{1B} 细胞株, 构建 HEK293 α_{1B} 细胞膜色谱系统, 测定 9 种 α_1 -肾上腺素受体配体在系统中的容量因子($k'_{\text{HEK293}\alpha_{1B}}$), 对其亲和力排序, 并分别与大鼠肝脏组织匀浆和原代培养的肝细胞制备的细胞膜色谱系统测得的容量因子进行相关性研究。结果 细胞膜色谱法测定 9 种配体的亲和力顺序与文献报道完全一致, 配体在 HEK293 α_{1B} 细胞膜色谱柱的保留时间最长, 在大鼠肝脏组织匀浆细胞膜色谱柱的保留时间最短。结论 细胞膜色谱法用于亚型受体的研究准确、可行; 与大鼠肝脏组织匀浆和原代培养的肝细胞制备的细胞膜色谱系统比较, 应用 HEK293 α_{1B} 细胞株制备的细胞膜色谱系统具有更高的精确性和灵敏性。

关键词:细胞膜色谱法; 细胞膜固定相; α_{1B} -肾上腺素受体

中图分类号: R967 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2009)12-2362-05

A method for improving the accuracy and sensitivity of cell membrane chromatography

WANG Yu, DENG Xiu-ling, YUAN Bing-xiang, HE Lang-chong

Xi'an Jiaotong University College of Medicine, Xi'an 710061, China

Abstract: Objective To improve the accuracy and sensitivity of cell membrane chromatography (CMC) and evaluate the feasibility of CMC in the study of subtype receptors. **Methods** Plasmids were used to transfer α_{1B} -AR cDNA into human embryonic kidney 293 (HEK293) cell lines to obtain cell lines stably overexpressing the subtype receptors. HEK293 α_{1B} cell membrane stationary phase (CMSP) was prepared by immobilizing the cell membrane on silica. The retention time of 9 α_1 -adrenoceptor ligands and capacity factors ($k'_{\text{HEK293}\alpha_{1B}}$) were calculated. The capacity factors of rat liver tissue and primary cultured rat hepatocytes were also calculated for a correlation analysis. **Results** The calculated capacity factors (k') were positively correlated to the published pKi values. The affinity rank orders were identical. The longest retention of the 9 α_1 -adrenoceptor ligands occurred on CMSP prepared with HEK293 α_{1B} cell lines, while CMSP obtained from rat liver tissue showed the shortest retention of the ligands. **Conclusion** CMC proves practical in the study of the subtype adrenoceptors. The accuracy and sensitivity of CMC can be improved using HEK293 α_{1B} cell membrane.

Key words: cell membrane chromatograph; cell membrane stationary phase; α_{1B} adrenergic receptor

G 蛋白偶联受体家族中, α_1 -肾上腺素受体 (ARs) 由于和临床关系密切已经被研究了近一个世纪, 并且为药物研究提供了许多靶点。小鼠 α_{1B} -AR 基因敲除实验表明 α_{1B} -AR 的缺失无论在体内和体外都可使 α_1 -AR 激活所起的作用减少, 并强烈提示它可能是 α_1 激动剂导致的血管收缩等血压反应的介导物质之一^[1]。韩启德等研究认为参与全身阻力血管和血压调节的 α_1 -AR 属 α_{1B} 亚型, 其还介导心肌细胞收缩和生长作用, 以及加强 β -AR 介导的正性变力效应^[2], α_{1B} -AR 选择性拮抗剂作为新型抗高血压药物将具有显著的优越性和广阔的前景^[3]。

1999 年, 我校贺浪冲等建立的细胞膜色谱法 (CMC) 为研究受体 - 配体结合作用提供了新途径

^[4-5]。该法将细胞膜固定在活化硅胶表面而制备成细胞膜固定相 (CMSP), 用高效液相色谱的方法研究药物或化合物与固定相上细胞膜及膜受体的相互作用, 受体 - 配体的亲和力可以直接由色谱参数测定。CMC 法已被成功的用于多个中药和天然药物中有效成分的研究^[6-12]。本室先前的研究表明采用组织匀浆细胞构建的 CMC 系统非特异性影响因素多, 灵敏性不高, 而且不能用于受体亚型药物的筛选^[13-15]。为了提高 CMC 法的特异性和灵敏性, 本实验采用质粒转染后得到的稳定膜高表达亚型受体细胞株, 构建了受体高表达 HEK293 α_{1B} 细胞膜色谱系统, 并分别与大鼠肝脏组织匀浆和原代培养的肝细胞制备的细胞膜色谱系统进行相关性研究, 现对我们目前的研究进展作一阶段性的报道。放射配体结合试验已证明大鼠肝细胞表达的 α_1 -AR 仅为 α_{1B} -AR^[16]。

1 实验材料

1.1 药品与试剂

收稿日期: 2009-05-23

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30171079)

作者简介: 王 瑜 (1979-), 男, 硕士

通讯作者: 邓秀玲, 女, 博士生导师, 电话: 029-82657497, E-mail: dengxl@mail.xjtu.edu.cn

羟甲唑啉 (Oxymetazoline)、5-甲基乌拉地尔 (5-MU) 购自 RBI 公司; RS-17053 购自 Roche Bioscience; 去甲肾上腺素 (Norepinephrine)、哌唑嗪 (Prazosin)、酚妥拉明 (Phentolamine)、苯肾上腺素 (Phenylephrine)、甲氧明 (Methoxamine) 和 BMY7378 购自 Sigma 公司。所有 9 种配体用三蒸水溶解, 浓度 $3 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。DMEM 高糖干粉培养基 (GIBCO)、小牛血清 (杭州四季青)、L-histidinol、胰蛋白酶、HEPES 和 Ⅰ型 Collagenase (Sigma); 大孔球形硅胶 (粒度 $7 \mu\text{m}$, 孔径 100 nm) 购自中国科学院化学研究所。色谱用水自制 (色谱纯)。

1.2 动物

SD 大鼠雌雄不限, 体质量 (205.4 ± 13.9) g, 清洁级, 由西安交通大学实验动物中心提供 (陕医动证字 08-005)。

1.3 仪器

Gilson 高效液相色谱系统, 包括 510 泵, 486 型紫外检测器, 7125 型手动进样阀 (美国 Rheodyne) 和 Anastar 色谱工作站 (天津奥泰科技); 410 型低温冷冻高速离心机 (德国 HERMLEZK); AS5150A 超声振荡仪 (美国 Auto Science); TB-85 型循环水浴 (日本 SHIMADZU)。

2 实验方法

2.1 细胞培养和转染

HEK293 细胞株在含有 10% 小牛血清、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素和 $100000 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素的高糖 DMEM 培养基中 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 培养, 用磷酸钙沉淀法将含仓鼠 α_{1B} -AR cDNA 的 pREP4 质粒转染至 HEK293 细胞, 每个 100 mm 平皿中加入 cDNA $20 \mu\text{g}$ 。培养 3 d 后, 按照质粒标记加入 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ hygromycin (pREP4/ α_{1B}) 进行筛选, 获得稳定膜高表达 HEK293 α_{1B} -AR 细胞株, 并持续在含有筛选抗生素的 DMEM 培养基中培养、传代。并将部分未转染细胞培养用于空白对照。

2.2 HEK293 α_{1B} -AR 高表达细胞膜的制备

当细胞生长状态良好时消化分离。用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 将细胞悬液在 $4000 \times g$ 离心 10 min, 沉淀加入一定量的低渗液, 超声振荡处理 20 min, 取部分上清液在倒置显微镜下观察证实其已经破膜, 再于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $12000 \times g$ 离心 10 min, 弃上清, 沉淀中加入适量生理盐水, 摇匀, 即为 HEK293 α_{1B} -AR 细胞膜悬液。上述操作均在 $0 \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$ 进行。本课题组多年研究结果证实, 采用此法进行细胞膜制备的重现性很好。

2.3 HEK293 α_{1B} -AR 细胞膜色谱柱的制备

HEK293 α_{1B} -AR 细胞株 CMSP 由 HEK293 α_{1B} -AR 细胞株的细胞膜固定在硅胶载体制备而成。

首先制细胞膜的吸附等温线, 计算硅胶饱和吸附量, 制备相应膜固定相的初始细胞膜浓度。然后取活化硅胶 20 mg, 加入膜制备, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 摇床上震荡 60 min, 平衡后离心, 沉淀物用 0.6 ml 的 Tris-HCl 洗涤制备而成 HEK293 α_{1B} -AR CMSP。CMSP 用低压湿法灌装在 $10 \times 2 \text{ mm}$ 的不锈钢色谱柱中^[4-5]。另以同法制备未转 α_{1B} -AR 的 HEK293 细胞膜色谱柱作为空白对照。

2.4 大鼠肝脏组织匀浆细胞膜色谱柱的制备

取健康 SD 大鼠, 乙醚麻醉后迅速开腹, 取出肝脏, 置冰生理盐水中, 清洗数次以洗净余血, 用眼科剪剪取部分肝脏组织, 剪碎, 加入 10 倍量 (W/V) 冷的生理盐水, 匀浆机制备匀浆。制得匀浆四层纱布过滤, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下 $400 \times g$ 离心 10 min, 弃沉淀, 上清在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下 $4000 \times g$ 离心 10 min。沉淀再以生理盐水反复洗涤离心, 直至沉淀尽量洗去红细胞, 为均匀的乳白色。制膜方法和细胞膜色谱柱制备同 HEK293 α_{1B} -AR 细胞株。上述操作均在 $0 \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下进行。

2.5 原代培养的大鼠肝细胞细胞膜色谱柱的制备

大鼠肝细胞原代培养采用经典的 Ⅰ型 Collagenase 两步灌流法^[17]。简述如下: 实验大鼠术前 24 h 禁食水, 乙醚麻醉, 背位固定, 备皮消毒, 开腹, 门静脉插管并固定, 剪断下腔静脉的同时, 用 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 预热无钙灌流液快速灌流, 灌速 $20 \sim 30 \text{ ml/min}$, 20 min 后, 用含 0.05% 的胶原酶液灌流 10~15 min, 肉眼观察肝脏肿胀时取下。 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 振荡培养 15 min, 振荡结束后置冰水中冷却, 用 200 目尼龙网过滤, 滤液在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 以 $200 \times g$ 离心 3~5 min, 弃上清, 用清洗液以同上条件清洗离心三次, 得到肝实质细胞悬液。常规培养。当细胞生长状态良好时制膜, 制膜方法和细胞膜色谱柱制备同 HEK293 α_{1B} -AR 细胞株。

2.6 细胞膜色谱实验

根据本研究室先前采用的色谱条件和预实验结果^[4-5], 采用以下色谱条件: 分别用 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液 ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 7.4) 平衡细胞膜色谱柱 3~4 h 使色谱体系达到稳定平衡, 流速保持 $0.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, 紫外检测器波长 280 nm, 所有 9 种配体用三蒸水溶解, 浓度 $3 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。除了大鼠肝脏组织匀浆细胞膜色谱柱进样 $10 \mu\text{l}$, 其他各组进样 $5 \mu\text{l}$ 。所有溶液都经过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤器过滤。

2.7 数据处理

分别记录 9 种配体在 HEK293 α_{1B} -AR 细胞膜色谱柱、空白对照组 HEK293 细胞膜色谱柱、大鼠肝脏组织匀浆细胞膜色谱柱、原代培养的大鼠肝细胞细胞膜色谱柱上的保留时间 ($n=3 \sim 4$), 计算其在三种细胞膜色谱柱上的容量因子 ($k'_{\text{HEK293 } \alpha_{1B}}$ 、 $k'_{\text{鼠肝匀浆 } \alpha_{1B}}$ 和 $k'_{\text{鼠肝培养 } \alpha_{1B}}$) 并按照大小排序, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。容量因子

由公式 $k'=(t_R-t_0)/t_0$ 计算得出,其中 t_R 是配体的保留时间,而 t_0 是溶剂的保留时间。数据分析采用 SPSS 11.0、Sigmaplot 8.0 和 GraphPad Prism 2.01 软件, $P<0.05$ (双侧)为具有显著性差异。

3 结果

经过鉴定,转染后获得的 HEK293 α_{1B} -AR 细胞株含有受体密度高达 $773 \pm 164 \text{ fmol} \cdot \text{mg} \text{ mol}^{-1}$ 蛋白(α_{1B})^[18],完全可满足本实验稳定高表达亚型受体的要

求。在色谱体系中,容量因子(k')可反映药物在固定相和流动相中分配的摩尔比。在 CMC 中,由于细胞膜完全覆盖硅胶表面^[4-5],配体与细胞膜表面受体相互作用时, k' 可用于描述药物分子与细胞膜的作用特征,即 k' 越大,其亲和力越大。

3.1 CMC 法测得 9 种配体在 HEK293 α_{1B} -AR 色谱柱上的容量因子

容量因子($k'_{\text{HEK293 } \alpha_{1B}}$)的顺序见表 1,图 1。

表 1 不同 α_1 -AR 配体与 HEK293 α_{1B} -AR 色谱柱结合测得的容量因子

Tab. 1 Capacity factors of different α_1 -AR ligands binding to HEK293 α_{1B} -AR measured by CMC (Mean \pm SD)

Ligands	Control t_R (min)	t_R mean(min)	t_0 mean(min)	$k'_{\text{HEK293 } \alpha_{1B}}$	CV(%)
Agonist					
Norepinephrine	0.461 \pm 0.018	8.72 \pm 0.22	0.088	98.2 \pm 1.5	1.5
Phenylephrine	0.477 \pm 0.006	3.227 \pm 0.098	0.087	35.81 \pm 0.56	1.6
Methoxamine	0.487 \pm 0.007	1.457 \pm 0.035	0.087	15.82 \pm 0.29	1.8
Oxymetazoline	0.558 \pm 0.024	11.5 \pm 1.2	0.088	130 \pm 20	15.4
Antagonist					
Phentolamine	0.675 \pm 0.021	15.9 \pm 2.5	0.085	185 \pm 19	10.3
Prazosin	0.765 \pm 0.021	20.1 \pm 3.7	0.090	219 \pm 27	12.3
RS-17053	0.702 \pm 0.045	14.4 \pm 1.3	0.080	180 \pm 16	8.9
5-methylurapidil	0.550 \pm 0.013	13.9 \pm 2.3	0.089	156 \pm 29	18.6
BMY7378	0.548 \pm 0.008	5.09 \pm 0.23	0.090	55.6 \pm 2.2	4.0

Capacity factors were calculated from $k'=(t_R-t_0)/t_0$, where t_R is retention time of ligands, t_0 is retention time of solvent. Data are mean \pm SEM of 3-4 experiments, CV=(standard deviation / mean)* 100%.

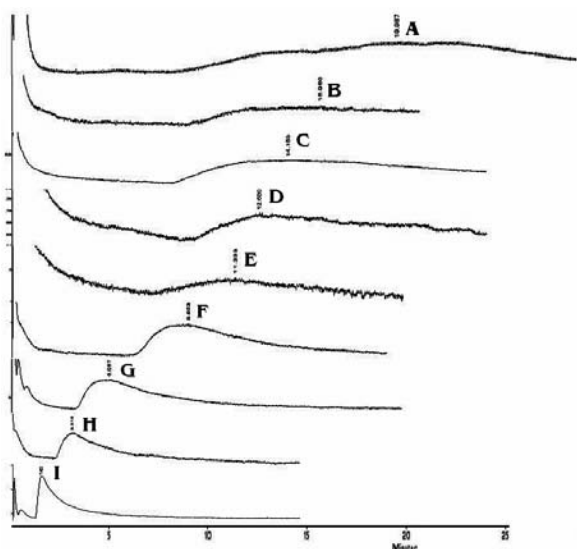


图 1 不同 α_1 -AR 配体在 HEK293 α_{1B} -AR 色谱柱上的色谱图
Fig. 1 Example of the elution profiles for different ligands of α_1 -adrenoceptor($3 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) run on HEK293 α_{1B} -AR cell membrane chromatographic column (50 mm \times 2 mm i.d.) Mobile phase: Phosphate-buffered saline solution buffer (5 mmol/L, pH7.4). Wavelength: 280 nm. Retention time: (A) Prazosin>(B) Phentolamine>(C)RS-1705>(D)5-methylurapidil>(E)Oxymetazoline >(F)Norepinephrine>(G)BMY7378>(H)Phenylephrine>(I)Methoxamine.

3.2 9 种配体的 CMC 法与放射性配体结合法研究 α_{1B} -AR 的相关性研究

由表 2、图 2 可知,将 CMC 法测得的 $k'_{\text{HEK293 } \alpha_{1B}}$ 与文献报道应用 RLBA 测定的 9 种配体对相同亚型受体细胞株的 $\alpha_{1B} \text{ p}K_i$ 值进行比较,其亲和力顺序一致。经相关分析, $k'_{\text{HEK293 } \alpha_{1B}}$ 与 $\alpha_{1B} \text{ p}K_i$ 有强相关性($r=0.943$ 、 0.849), $P<0.01$ 。

3.3 CMC 法测得 9 种配体对三种不同细胞膜色谱柱 α_{1B} -AR 容量因子的相关性研究

测得三组的容量因子顺序除个别位次有所不同,结果与文献报道亲和力顺序相一致(表 3、图 3)。大鼠肝脏匀浆细胞膜色谱柱在其他条件相同的情况下,需要 $10 \mu\text{l}$ 才能表现出较明显的保留,大鼠肝脏原代培养细胞膜色谱柱和 HEK293 α_{1B} -AR 细胞膜色谱柱仅需 $5 \mu\text{l}$ 即可产生明显的保留。三组容量因子数据两两进行相关分析,结果呈强相关性(表 4)。总体看,配体在 HEK293 α_{1B} -AR 细胞膜色谱柱的保留时间最长,容量因子最大;在大鼠肝脏匀浆细胞膜色谱柱的保留时间最短,容量因子最小。

4 讨论

本课题用细胞膜色谱法测定 9 种不同的 α - 肾上

表 2 $k'_{HEK293\ \alpha_{1B}}$ 与已发表用 RLBA 法测得对应配体的 pK_i 相关分析

Tab.2 Correlation analysis between $k'_{HEK293\ \alpha_{1B}}$ and the published α_{1B} pK_i values

Ligands	$k'_{HEK293\ \alpha_{1B}}$	Cloned α_{1B} pK_i		
		pK_i^a	$pK_i^{b,c}$	pK_i^d
Agonist				
Norepinephrine	98.2±1.5	6.54±0.02	6.03±0.07 ^b	-
Phenylephrine	35.81±0.56	5.90±0.09	-	-
Methoxamine	15.82±0.29	4.35±0.16	3.79±0.08 ^b	-
Oxymetazoline	130±20	6.69±0.06	6.47±0.07 ^b	-
Antagonist				
Phentolamine	185±19	8.14±0.07	7.05±0.04 ^c	-
Prazosin	219±27	10.26±0.07	9.34±0.31 ^c	9.16±0.08
RS-17053	180±16	-	-	7.06±0.09
5-MU	156±29	7.42±0.04	5.98±0.12 ^c	6.40±0.13
BMY7378	55.6±2.2	-	6.37±0.05 ^c	6.40±0.16
Pearson Correlation		0.943	0.849	0.736*
Sig. (2-tailed)		0.001	0.016	0.264*
Number	9	7	7	4

Pearson Correlation: capacity factor versus pK_i . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed). Literature values shown from ^a(19), ^b(20), ^c(21), ^d(22). * There is no correlation between $k'_{HEK293\ \alpha_{1B}}$ ($n=9$) and α_{1B} pK_i d values ($n=4$).

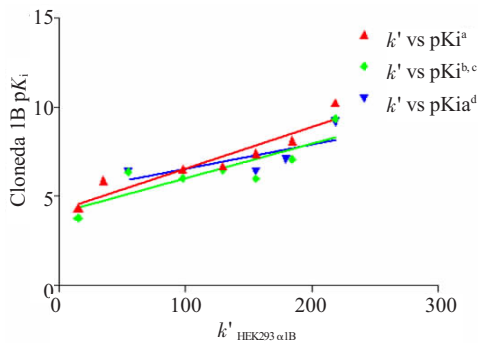


图 2 $k'_{HEK293\ \alpha_{1B}}$ 与已发表用 RLBA 法测得对应配体的 pK_i 相关分析

Fig.2 Linear regression between $k'_{HEK293\ \alpha_{1B}}$ and published α_{1B} pK_i values

表 3 CMC 法测得不同配体在三种 α_{1B} -AR 细胞膜色谱柱上的容量因子对比

Tab. 3 Comparative analysis of different cell-based capacity factors using CMC (Mean±SD)

Ligands	$k'_{鼠肝匀浆\ \alpha_{1B}}$	$k'_{鼠肝培养\ \alpha_{1B}}$	$k'_{HEK293\ \alpha_{1B}}$
Agonist			
Norepinephrine	14.393±1.354	31.453±1.500	98.197±1.527
Phenylephrine	3.277±0.144	10.990±0.102	35.812±0.563
Methoxamine	1.835±0.075	7.363±0.395	15.823±0.288
Oxymetazoline	16.815±2.233	56.820±14.912	130.384±19.699
Antagonist			
Phentolamine	40.564±1.236	152.516±8.849	184.688±19.102
Prazosin	56.909±10.573	178.785±28.518	219.497±26.620
RS-17053	26.348±6.997	141.855±10.598	179.994±15.854
5-methylurapidil	16.924±0.899	111.364±11.841	155.915±28.913
BMY7378	7.984±1.349	23.331±0.178	55.574±2.219

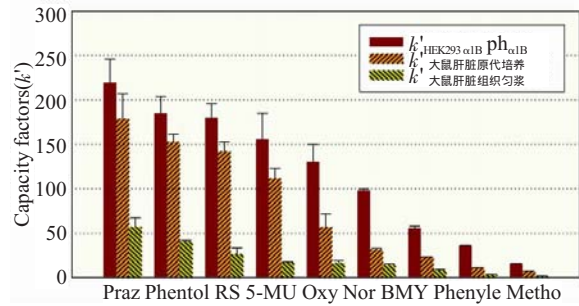


图 3 CMC 法测得不同配体在三种 α_{1B} -AR 细胞膜色谱柱上的容量因子对比

Fig. 3 Comparative analysis of different cell-based capacity factors using CMC

From high to low: Praz-(Prazosin); Phentol-(Phentolamine); RS-(RS-17053); 5-MU-(5-methylurapidil); Oxy-(Oxymetazoline); Nor-(Norepinephrine); BMY-(BMY7378); Phenyl-(Phenylephrine); Metho-(Methoxamine).

表 4 不同细胞膜色谱柱测得容量因子的相关分析

Tab. 4 Correlation analysis between different cell-based capacity factors

		Correlations		
		$k'_{鼠肝匀浆\ \alpha_{1B}}$	$k'_{鼠肝培养\ \alpha_{1B}}$	$k'_{鼠 HEK293\ \alpha_{1B}}$
$k'_{鼠肝匀浆\ \alpha_{1B}}$	Pearson Correlation	1	0.919**	0.902**
	Sig.(2-tailed)		0.000	0.001
	n	9	9	9
$k'_{鼠肝培养\ \alpha_{1B}}$	Pearson Correlation	0.919**	1	0.961**
	Sig.(2-tailed)	0.000		0.000
	n	9	9	9
$k'_{鼠 HEK293\ \alpha_{1B}}$	Pearson Correlation	0.902**	0.961**	1
	Sig.(2-tailed)	0.001	0.000	
	n	9	9	9

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

腺素受体配体与 HEK293 α_{1B} -AR 色谱柱上 α_{1B} -AR 亲和所得容量因子 ($k'_{HEK293\ \alpha_{1B}}$), 并与文献报道用放射配体结合法 (RLBA) 测定的其对相同的亚型受体细胞株的 pK_i 值进行了相关性研究。结果显示: ① 本实验构建的 HEK293 α_{1B} -AR 细胞膜色谱柱测得的容量因子可被用于描述配体和 HEK293 α_{1B} -AR 色谱柱上 α_{1B} -AR 的亲和力。容量因子越大, 其亲和力越大。② 采用 HEK293 α_{1B} -AR 细胞株构建细胞膜色谱系统进行 CMC 研究, 特异性和灵敏性高于大鼠肝脏组织匀浆和原代培养大鼠肝脏细胞构建的细胞膜色谱系统。

在数以千万计的化合物库中寻找有效化合物和目标化合物, 通过筛选和优化确定先导化合物, 然后进行规范的新药研究, 这是药物筛选和开发研究的理性过程。显然筛选模型越多越先进, 发现新药的机率就越高。据统计, 目前已上市药物的靶点分布是^[23]: 受体占 45%, 酶占 28%, 激素和细胞因子占 11%, 离子通道占 5%, DNA 和核受体各占 2%, 其他未知占

7%。作为最重要的靶点,应用受体和关键酶作为靶点的药物筛选技术应运而生。由于它们一般存在于机体内,因数量有限而不利于进行大规模筛选。随着重组受体技术的发展,基因重组技术将受体的配基、亚基或靶酶的活性中心等,在细胞株或微生物中成功的大量表达可以解决这一难题。用重组技术制备的受体具有纯度高,制备量大,成本低,直接获得受体亚型,结果与人体实验的结果直接相关等优点^[24]。直接将重组受体和药物筛选结合已经取得了巨大的成功。

本实验评价了 CMC 法研究配体受体相互作用,尤其是评价了 CMC 法用于亚型受体研究的科学性和可行性,提供受体高表达 HEK293 α_{1B} 细胞膜色谱柱和技术路线,为肾上腺素受体亚型高选择性配体的研究提供了新的方法。本实验首次将基因转染和细胞培养、受体亚型研究、细胞膜色谱法有机的结合在一起,为 CMC 法的论证和不断完善打下坚实的基础。目前,构建的稳定高表达 HEK293 α_{1B} 细胞膜色谱模型的灵敏度和特异度基本可满足化合物和中药提取物“初筛”的要求。

致谢:衷心感谢北京大学第三医院血管医学研究所张幼怡教授和韩启德院士对本课题的大力支持;感谢国家自然科学基金委对本课题的资助。

参考文献:

- [1] Cavalli A, Lattion AL, Hummler E. Decreased blood pressure response in mice deficient of the α_{1B} -adrenergic receptor [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94 (21): 11589-94.
- [2] Han QD. 韩启德院士文集[M]. Beijing: Beijing Press, 2000: 19-21.
- [3] Han QD. Physiological and pathophysiological significance of co-existence of three subtypes of α_1 -adrenoceptor in heart and blood vessels [J]. Chin Med J, 1999, 112(10): 950-5.
- [4] He LC, Wang SC, Geng XD. Coating and fusing cell membrane on silica surface and its chromatographic characteristics [J]. Chromatographia, 2001, 54(1): 71-6.
- [5] 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[J]. 科学通报, 1999, 44 (6): 632-7.
- [6] 赵惠茹, 杨广德, 贺浪冲. 用细胞膜色谱法筛选当归中的有效成分[J]. 中国药理学杂志, 2000, 35(1): 13-5.
- [7] 张汉利, 杨广德, 贺浪冲. 太白花活性成分的筛选与药理作用相关性研究[J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(2): 92-4.
- [8] 高 琨, 贺浪冲, 杨广德. 用细胞膜色谱法筛选研究红毛七中的有效成分[J]. 中国药理学杂志, 2003, 38 (1): 14-6.
- [9] 赵小娟, 党高潮, 杨广德. 淫羊藿根和叶活性成分的分析 and 比较 [J]. 分析化学, 2002, 30 (2): 195-7.
- [10] 张宇洁, 贺浪冲. 用细胞膜色谱模型筛选长春七抑制 HeLa 细胞增殖的活性成分[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(6): 463-5.
- [11] Liang MJ, He LC, Yang GD. Screening, analysis and *in vitro* vasodilatation of effective components from Ligusticum Chuanxiong [J]. Life Sci, 2005, 78(2): 128-33.
- [12] 梁明金, 贺浪冲. 藁本内酯和丁烯西夫内酯对 bFGF 诱导的大鼠平滑肌细胞异常增殖的抑制作用[J]. 药学学报, 2006, 41(2): 161-5.
- [13] 候 进, 袁秉祥, 贺浪冲. 用细胞膜色谱法研究药物和毒蕈碱受体的亲和作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2003, 17 (1): 70-3.
- [14] Yuan BX, Hou J, He LC. Evaluation of drug-muscarinic receptor affinities using cell membrane chromatography and radioligand binding assay in guinea pig jejunum membrane [J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26 (1): 113-6.
- [15] Yuan BX, Hou J, Yang GD, et al. Comparison of Determination of Drug-Muscarinic Receptor Affinity by Cell-Membrane Chromatography and by Radioligand-Binding Assay with the Cerebrum Membrane of the Rat [J]. Chromatographia, 2005, 61 (8): 381-4.
- [16] García-Sáinz JA, Casas-González P, Romero-Avila MT, et al. Characterization of the hepatic α_{1B} -adrenoceptors of rats, mice and hamsters [J]. Life Sci, 1994, 54 (25): 1995-2003.
- [17] 徐叔云, 卞如濂. 药理实验方法学[M]. 第 3 版, 北京: 人民卫生出版社, 2003, 581-3.
- [18] Lei BL, Zhang YY, Han QD. Sustained norepinephrine stimulation induces different regulation of expression in three α_1 -adrenoceptor subtypes [J]. Life Sci, 2001, 69(3): 301-8.
- [19] Buckner SA, Oheim KW, Morse PA, et al. α_1 -adrenoceptor induced contractility in rat aorta is mediated by the α_{1D} subtype [J]. Eur J Pharmacol, 1996, 297 (3): 241-8.
- [20] Michel MC, Insel PA. Comparison of cloned and pharmacologically defined rat tissue α_1 -adrenoceptor subtypes [J]. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 1994, 350(2): 136-42.
- [21] Testa R, Destefani C, Guarneri L. The alpha 1d-adrenoceptor subtype is involved in the noradrenaline-induced contractions of rat aorta[J]. Life Sci, 1995, 57(13): L159-63.
- [22] Zhang YY, Xu KM, Han QD. α_1 -adrenoceptor subtypes mediating inotropic responses in rat heart [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1999, 291(2): 829-36.
- [23] Hardman JG, Limbird LE. Goodman's & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics [M]. 9th edition. San Francisco: McGraw-Hill, 1996, 29-45.
- [24] 朱宝泉. 基因工程技术在医药工业中的应用及进展[J]. 中国医药工业杂志, 1997, 28 (2): 56-8.