

化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料 快速筛选大黄降血脂活性成分

边惠琴¹, 武晓玉^{1,2,3*}, 夏鹏飞^{1,2,3},
段文达¹, 杨飞霞¹, 李娇娇¹, 赵磊^{1,2,3*}

¹甘肃中医药大学药学院; ²甘肃中医药大学 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室;

³甘肃中医药大学 甘肃省道地药材质量标准化研究与推广工程实验室, 兰州 730000

摘要:为增加细胞膜生物亲和材料使用寿命,建立以 APTES 修饰硅胶为载体的 L02 细胞膜生物亲和材料,并将其应用于大黄降血脂活性成分的快速筛选。采用油酸刺激 L02 肝细胞,建立肝脂肪变性模型;硅胶与 APTES、戊二醛发生反应,在硅胶表面引入醛基,游离醛基与细胞膜上富含的氨基通过共价键连接;扫描电镜和红外光谱进行表征;对大黄 30% 乙醇提取液进行吸附,HPLC 分析吸附结果。通过扫描电镜证实材料表面覆盖有一层细胞膜,红外光谱也出现 3 442、2 942 cm⁻¹ 的-NH 键特征吸收峰,表明材料制备成功;HPLC 分析表明:11 种化学成分被特异性吸附,分别为:芦荟大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷、大黄酸-8-O-β-D-葡萄糖苷、大黄酚-8-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-O-β-D-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚及 2 种未知成分。制备的化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料能够延长使用次数,也可用于大黄及其他中药降血脂活性成分的快速筛选。

关键词:生物亲和材料; 化学修饰; 大黄; L02 肝细胞; 高血脂

中图分类号:R284

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)3-0375-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.3.003

Rapid screening of lipid-lowering active constituents from *Rheum palmatum* L. with chemically modified L02 liver membrane bioaffinity material

BIAN Hui-qin¹, WU Xiao-yu^{1,2,3*}, XIA Peng-fei^{1,2,3},
DUAN Wen-da¹, YANG Fei-xia¹, LI Jiao-jiao¹, ZHAO Lei^{1,2,3*}

¹School of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine; ²Key Laboratory of Chemistry and Quality for Traditional Chinese Medicine (TCM) of Colleges of Gansu Province, Gansu University of Chinese Medicine;

³Gansu Province Engineering Laboratory for TCM Standardization Technology and Popularization, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

Abstract: To extend life span of cell membrane material, a novel type of 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) decorated silica gel was employed. A L02 hepatic steatosis cell model was established using oleic acid. Silica gel was decorated with glutaraldehyde with the help of APTES, which react with the amino groups on L02 hepatic steatosis cell membranes to form a covalent bond. For the material characterization was used Scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The material was selected as an adsorptive material to screen for the potential active ingredients of *Rheum palmatum* L. by HPLC. SEM confirmed that the surface of silica gel was obviously covered with cell membrane. The characteristic absorption peaks of -NH bond were 3 442 and 2 942 cm⁻¹, indicating that the material was successfully prepared. HPLC analysis showed that 11 chemical components were specifically adsorbed, which were identified as aloë-emodin-8-O-β-D-glucopyranoside, rhein-8-O-β-D-glucopyranoside, emodin-8-O-β-D-glucoside, physcion-8-O-β-D-monoglucoside, aloë-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, physcion and two unknown components. The chemically modified L02 liver membrane

收稿日期:2021-10-08 接受日期:2022-02-23

基金项目:甘肃省教育厅:青年博士基金(2021QB-079);甘肃省“双一流”科研重点项目(GSSYXM-05);甘肃中医药大学引进人才科研启动基金(2018YJRC-02);甘肃省科技厅项目(1310RJZA100)

*通信作者 Tel:86-931-8762539; E-mail:wxypzw@163.com, zzyhx@gczy.edu.cn

bioaffinity material can prolong its life span and use for rapid screening of the lipid-lowering active ingredients of *Rheum palmatum L.* and other traditional Chinese medicine.

Key words: bioaffinity material; chemical modification; *Rheum palmatum* L.; L02 liver cell; hyperlipidemia

传统中药活性成分筛选以活性追踪为主,其以单体组分为筛选对象,存在工作量大、操作繁琐、效率低等缺点。而与传统活性追踪法相比,细胞膜色谱(cell membrane chromatography, CMC)是近年发展迅速的一种生物亲和色谱技术,具有特异性识别和高效分离的特性。CMC基本原理是将细胞膜结合到硅胶载体表面制成固定相,细胞膜受体可与药物分子产生特异性结合,利用色谱分析法研究药物分子与细胞膜受体的相互作用规律^[1,2]。CMC集合了色谱技术、细胞分子生物学及受体药理学的优点,实现了色谱柱内近似动态地模拟药物活性成分在体内的作用过程;相比于常用吸附剂(如:离子交换树脂、大孔吸附树脂等),CMC具有色谱分离与活性筛选相结合的优势,且操作方便、快速稳定、灵敏度高,尤其适用于中药等复杂体系的活性成分筛选。

细胞膜色谱制备时,根据细胞膜与硅胶载体的不同结合形式,可将其分为:物理吸附和化学修饰。物理吸附细胞膜生物亲和色谱是利用细胞膜自身的融合作用和硅胶表面硅羟基的吸附作用制备而成;这种作用力比较弱,细胞膜易从载体上脱落,导致色谱柱寿命短^[3,4]。化学修饰细胞膜生物亲和色谱是硅胶和细胞膜以共价键结合;硅胶的硅醇基与硅烷偶联剂发生缩合反应引入氨基,氨基与戊二醛分子发生交联反应,硅胶表面即可得到一端游离的醛基官能团;细胞膜上含有大量氨基基团,在室温环境中易发生醛氨缩合反应,从而达到硅胶和细胞膜共价连接的目的。化学修饰细胞膜生物亲和色谱中载体硅胶与细胞膜共价键连接、比较稳定、细胞膜不易脱落,可延长色谱柱寿命^[5,6]。

大黄是甘肃道地药材,为临床常用中药之一;具有抗菌、抗肿瘤、抗炎、抗病毒、降血脂等药理作用^[7-9]。许多学者及课题组前期研究均证实了大黄降血脂作用,且本课题组利用高脂血症大鼠筛选出降血脂有效部位为30%乙醇提取液,但其具体药效物质基础尚不明确^[10-12];课题组也制备了物理吸附L02肝细胞膜生物亲和色谱材料,但其细胞膜脱落较严重,使用次数有限。鉴于此,本实验制备APTES修饰硅胶为载体的L02肝细胞膜生物亲和色谱材料,利用细胞膜表面的靶点对大黄30%乙醇

提取液中化学成分进行特异性吸附,HPLC分析吸附前后各化学成分色谱峰变化,以色谱峰峰面积变化率为依据,快速筛选大黄降血脂活性成分;并考察该材料的重复使用性能,为高通量筛选大黄降血脂药效物质基础提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验仪器

85-2型恒温磁力搅拌器(海司乐仪器有限公司);BSA224S电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司);Waters Alliance型高效液相色谱仪(四元泵、自动进样器、柱温箱、PDA检测器);IMARK酶标仪(美国Bio-Rad公司);ALPHA-T红外光谱仪(布鲁克仪器有限公司);高速冷冻离心机(美国Beck-man-Coulter公司);JY92-II DN细胞破碎仪(宁波新芝科技股份有限公司);DGX-9143BC-1型电热恒温干燥箱(上海福玛试验设备有限公司)。

1.2 实验试剂

硅胶(5 μm,批号:20190316,中国青岛美高化工有限公司);3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES,批号:SLBB5978V)、油酸(批号:SLBRI87V)均购自SIGMA公司;磷酸盐缓冲溶液(批号:AQ29629583)、链霉素/青霉素(批号:20201116)、胰酶(批号:20210629)、1640培养液(批号:AG29643109)、胎牛血清(批号:21040702)、1M Tris-HCl溶液(批号:20190821)、BCA蛋白试剂盒(批号:20191022)、Na⁺、K⁺-ATP酶试剂盒(批号:20200629)均购于Solarbio公司;BSA蛋白粉(批号:3131053,购于YESEN公司);戊二醛(批号:EU2RDH1X,萨恩化学技术(上海)有限公司);甲醇、乙腈均为色谱纯(Merk公司);人L02肝细胞(普诺赛生命科技有限公司)。乙腈均为色谱纯(Merk公司);人L02肝细胞(普诺赛生命科技有限公司)。

1.3 L02肝脂肪变性细胞膜提取^[13]

0.5 mmol/L油酸刺激L02肝细胞,建立脂肪变性模型;利用差速离心法提取细胞膜,具体步骤如下:1 mL PBS洗涤L02肝脂肪变性细胞,弃去PBS;加1 mL 0.25%胰酶消化,轻轻吹打混匀,在镜下观察细胞全部脱落;再加1 mL PBS终止消化,160 × g、4 °C下离心10 min,保留细胞沉淀;用1 mL PBS洗涤细胞沉淀2次。细胞沉淀在50 mM Tris-HCl溶

液中溶胀 30 min, 在破碎功率 720 W、破碎时间 2 s, 冷却间隔 2 s 的冰浴条件下, 破碎 3 min; 细胞碎片混悬液在 $1000 \times g$ 、4 ℃下离心 10 min, 保留上清液; 上清液进一步在 $12000 \times g$ 、4 ℃下离心 20 min, 即得细胞膜沉淀。

1.4 化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料的制备及表征^[5]

称取硅胶 2 g, 在 105 ℃活化 2 h。

精密称取活化硅胶 1 g, 加 100 mL 甲苯、1 mL APTES, N₂ 保护、110 ℃条件下加热回流 12 h; 反应结束后, $5000 \times g$ 离心 3 min, 甲苯冲洗沉淀; 沉淀加 50 mL 5% 戊二醛甲醇溶液, 常温下搅拌反应 2 h, 反应结束后, $5000 \times g$ 离心 3 min, 甲醇冲洗沉淀; 50 ℃真空干燥, 得 APTES 修饰硅胶。

取 APTES 修饰硅胶 0.1 g 置于圆底烧瓶中, 加 5 mL L02 肝脂肪变性细胞膜混悬液, 涡旋 3 min, 10 Mbar、0 ℃条件下搅拌反应 1 h; 然后放入 4 ℃冰箱中反应 12 h。反应结束后, $1000 \times g$ 、4 ℃条件下离心 10 min, 保留沉淀; PBS 洗涤沉淀, $1000 \times g$, 4 ℃条件下离心 10 min, 即得化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料。采用扫描电镜和红外光谱对其表征, 并测定细胞膜蛋白含量及 Na⁺、K⁺-ATP 酶活力。

1.5 吸附、解吸附

化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料加 1 mL 大黄 30% 乙醇提取液, 轻轻吹打并涡旋震荡 1 min, 37 ℃孵育 8 h; 孵育液在 $1000 \times g$, 4 ℃下离心 10 min, 上清液即共孵育残液。

化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料加 1 mL

蒸馏水, 轻轻吹打并涡旋震荡 1 min, $1000 \times g$, 4 ℃下离心 10 min, 上清液即洗涤液。

化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料加 1 mL PBS 溶液, 37 ℃孵育 6 h, 孵育液在 $1000 \times g$, 4 ℃下离心 10 min, 上清液即解离液。

HPLC 分析条件: ODS 柱 (15 mm (4.6 mm, μm); 流动相: 0.05% 甲酸水 (A), 乙腈 (B); 梯度洗脱程序: 0 ~ 10 min, 5% → 0% B; 10 ~ 15 min, 20% B; 15 ~ 30 min, 20% → 30% B; 30 ~ 50 min, 30% → 50% B; 50 ~ 60 min, 50% → 85% B; 60 ~ 65 min, 100% B; 柱温: 30 ℃; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 254 nm; 进样量: 10 μL 。

1.6 重复使用性能评价

为了考察该材料的重复使用性能, 对化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料进行 6 次吸附、解吸附实验, 用细胞膜蛋白含量及 Na⁺、K⁺-ATP 酶活力来评价重复使用性能。具体过程如下: 该材料加 1 mL 大黄 30% 乙醇提取液, 涡旋混匀, 37 ℃孵育 8 h; 孵育液 $1000 \times g$, 4 ℃下离心 10 min, 保留沉淀; 沉淀加 1 mL PBS 溶液, 37 ℃孵育 6 h, 孵育液在 $1000 \times g$, 4 ℃下离心 10 min, 保留沉淀; 测定沉淀(解吸附后)的细胞膜蛋白含量及 Na⁺、K⁺-ATP 酶活力; 重复测定 6 次。

2 结果与讨论

2.1 表征分析

硅胶、APTES 修饰硅胶、化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料扫描电镜图见图 1。

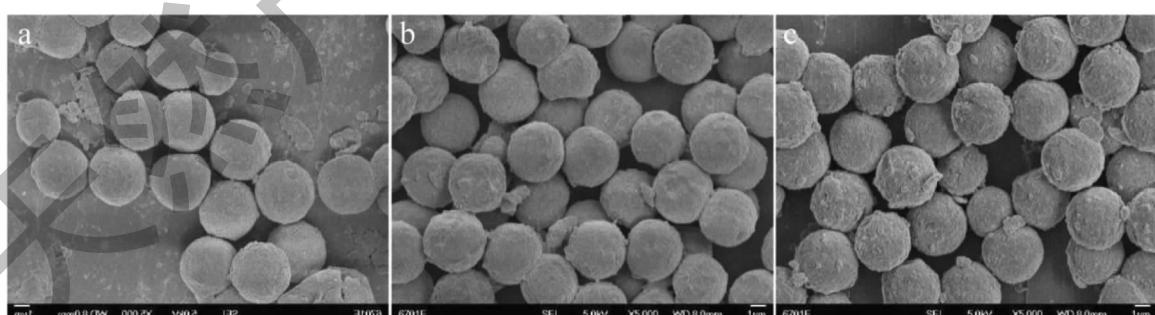


图 1 扫描电镜图 ($\times 10000$)

Fig. 1 SEM images of silica gel ($\times 10000$)

注:a. 硅胶;b. APTES 修饰硅胶;c. 化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料。Note:a. The silica gel;b. APTES modified silica gel;c. Chemical modification L02 liver membrane bioaffinity material.

图 1a 中硅胶表面光滑, APTES 修饰硅胶(图 1b)表面有一层絮状物, 较图 1a 硅胶表面粗糙, 推测

为 APTES 烷氧基与硅胶硅羟基反应所致。图 1c 表面明显覆盖有一层细胞膜, 说明 APTES 修饰硅胶上

的游离醛基与细胞膜表面氨基发生醛氨缩合反应，细胞膜键合到硅胶表面，推断化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料制备成功。

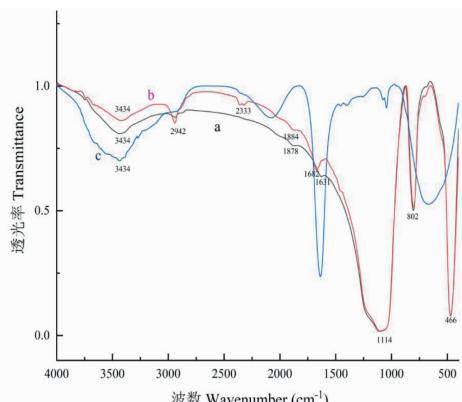


图 2 红外光谱图

Fig. 2 FTIR spectrum

注：a. 硅胶；b. APTES 修饰硅胶；c. 化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料。Note: a. The silica gel; b. APTES modified silica gel; C. chemical modification L02 liver membrane bioaffinity material.

表 1 细胞膜蛋白含量和 Na^+/K^+ -ATP 酶活力结果表 ($n=3$)

Table 1 Results of membrane protein content and Na^+/K^+ -ATP activity ($n=3$)

样品 Sample	细胞膜蛋白含量 Cell membrane protein content (mg/mL)	Na^+/K^+ -ATP 酶活力 Na^+/K^+ -ATP enzyme activity (U/mgprot)
硅胶	0	0
APTES 修饰硅胶	0	0
化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料	0.385 2	8.017 0

由表 1 可知，硅胶和 APTES 修饰硅胶细胞膜蛋白含量及 Na^+/K^+ -ATP 酶活力均为 0；化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料由于引入细胞膜，其细胞膜蛋白含量为 0.385 2 mg/mL， Na^+/K^+ -ATP 酶活力为 8.017 0 U/mgprot，表明化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料具有活性。

2.2 降脂活性成分筛选^[15]

大黄 30% 乙醇提取液、共孵育残液、混合对照品溶液、洗涤液、解离液的 HPLC 图见图 3。

由图 3a 可知，大黄 30% 乙醇提取液中各化学成分色谱峰峰形对称，分离度良好，说明优化的色谱条件稳定可行。图 3b 可以看出化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料吸附后，部分化学成分色谱峰峰面积减小，说明该成分和材料发生了特异性吸附。通过与混合对照品溶液化学成分保留时间及紫外光谱学特征进行对比，初步确定 1、2、4、5、7、8、9、10、11 号色谱峰分别为芦荟大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷、

硅胶、APTES 修饰硅胶、化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料红外光谱图见图 2。

图 2a 中 3434 cm^{-1} 处为 Si-OH 特征吸收峰， 1114 cm^{-1} 是 Si-O-Si 的反对称伸缩振动吸收峰， 802 cm^{-1} 和 466 cm^{-1} 为 Si-O-Si 摆摆振动和弯曲振动吸收峰。APTES 修饰硅胶（图 2b）在 2942 cm^{-1} 处出现氨基硅烷的 N-H 伸缩振动特征吸收峰， 1884 cm^{-1} 处出现 N-H 变形振动吸收峰^[14]。图 2c 中 3442 cm^{-1} 吸收峰变宽，推测是 Si-OH 与细胞膜上-NH₂ 键合所致，且 802 cm^{-1} 和 466 cm^{-1} 处 Si-O-Si 摆摆振动和弯曲振动吸收峰也消失，说明硅胶与细胞膜上氨基发生反应，所以化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料成功制备。

将硅胶、APTES 修饰硅胶、化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料分别混悬于 1 mL 生理盐水中，利用细胞膜蛋白试剂盒及 Na^+/K^+ -ATP 酶试剂盒测定细胞膜蛋白含量和 Na^+/K^+ -ATP 酶活力，结果见表 1。

表 1 细胞膜蛋白含量和 Na^+/K^+ -ATP 酶活力结果表 ($n=3$)

Table 1 Results of membrane protein content and Na^+/K^+ -ATP activity ($n=3$)

大黄酸-8-O- β -D-葡萄糖苷、大黄酚-8-O- β -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-O- β -D-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚；3、6 号色谱峰为未知成分。图 3d 洗涤液中没有出现色谱峰，说明特异性吸附成分与化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料结合牢固。图 3e 解离液中色谱峰极小，分析原因可能是特异性吸附成分和细胞膜上受体相结合，进入到细胞膜内部，进而造成解离液中色谱峰较小。

将 6 份共孵育残液进样分析，考察色谱峰面积的稳定性，结果见表 2。

由表 2 可知，共孵育残液中 11 个色谱峰峰面积 RSD 值均小于 1%，表明在优化色谱条件下，化学成分峰面积大小稳定。

通过测定大黄 30% 乙醇提取液、共孵育残液中各化学成分峰面积，按照公式 1 计算色谱峰峰面积变化率，以峰面积变化率大于 15% 为依据，筛选特异性吸附成分，结果见表 3。

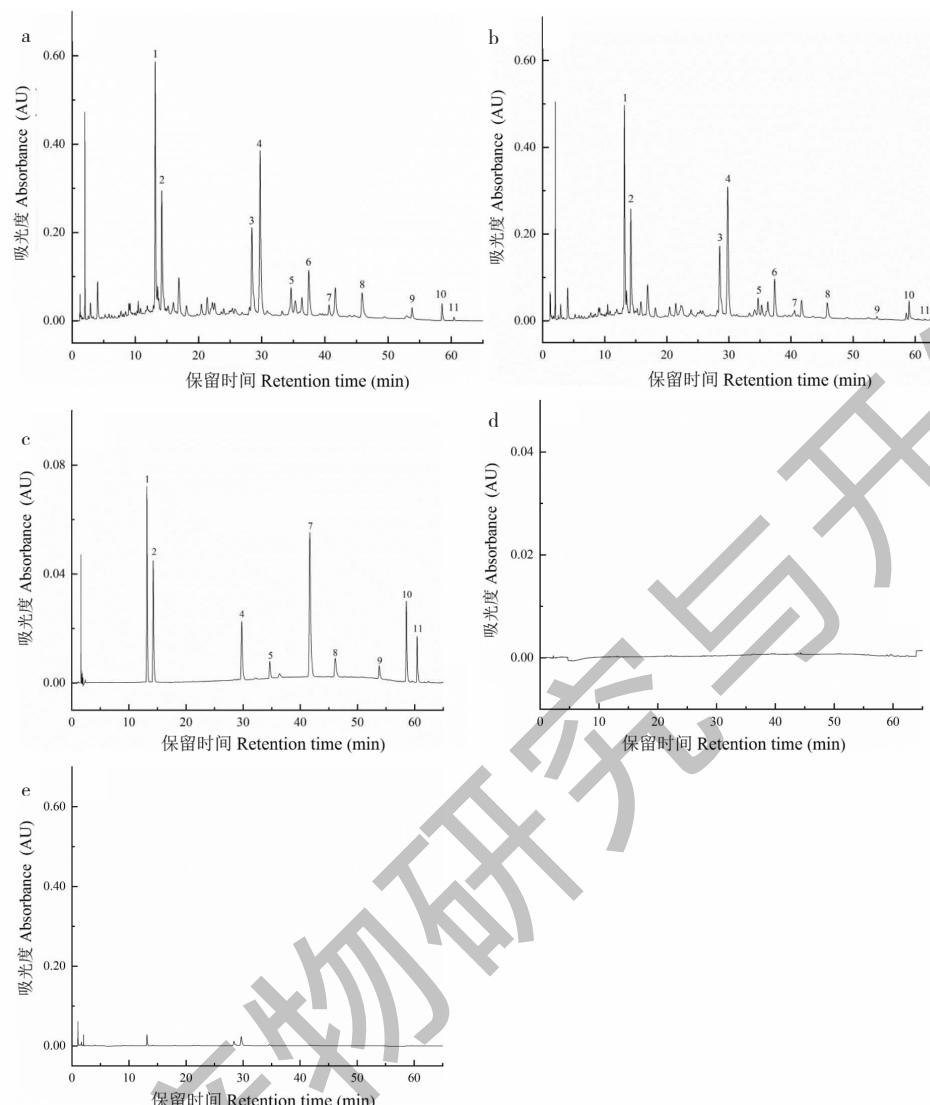


图 3 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms

注:a. 大黄 30% 乙醇提取液;b. 共孵育残液;c. 混合对照品溶液;d. 洗涤液;e. 解离液。Note:a. 30% ethanol extract of *Rheum palmatum* L.; b. Co-incubate residual liquid;c. Reference solution;d. Washing liquid;e. Desorption solution.

表 2 共孵育残液峰面积变化表($n=6$)Table 2 Peak area change of co-incubate residual liquid ($n=6$)

编号 No.	保留时间 t_R (min)	峰面积 1 S1	峰面积 2 S2	峰面积 3 S3	峰面积 4 S4	峰面积 5 S5	峰面积 6 S6	相对标准偏差 RSD(%)
1	13.12	4 205 063	4 229 231	4 243 320	4 248 901	4 200 610	4 204 242	0.51
2	14.24	3 101 810	3 133 144	3 131 417	3 135 935	3 151 863	3 153 061	0.59
3	28.37	2 753 241	2 703 854	2 707 320	2 735 430	2 733 211	2 732 787	0.69
4	29.67	4 699 230	4 661 890	4 670 307	4 697 658	4 696 644	4 697 584	0.35
5	34.58	629 231	624 358	622 092	626 017	621 849	618 231	0.61
6	37.63	1 352 325	1 324 232	1 333 415	1 348 486	1 346 408	1 345 677	0.80
7	41.61	663 111	676 567	666 864	672 861	664 465	662 661	0.85
8	46.09	680 765	691 032	684 190	681 704	678 133	677 545	0.73

续表2(Continued Tab. 2)

编号 No.	保留时间 <i>t_R</i> (min)	峰面积1 S1	峰面积2 S2	峰面积3 S3	峰面积4 S4	峰面积5 S5	峰面积6 S6	相对标准偏差 RSD (%)
9	53.79	87 405	88 665	86 416	86 920	86 614	86 638	0.96
10	58.55	173 278	173 032	173 045	176 348	173 518	173 433	0.73
11	60.44	12 693	12 896	12 796	12 973	12 930	12 841	0.79

表3 化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料吸附差异结果表

Table 3 Results of adsorption difference of chemically modified L02 liver membrane bioaffinity material

编号 No.	保留时间 <i>t_R</i> (min)	大黄 30% 乙醇提取液 30 % ethanol extract of <i>Rheum palmatum</i> L.	共孵育残液 Co-incubate residual liquid	峰面积差值 Difference in peak area	峰面积变化率 Change rate of peak area (%)
1	13.12	5 081 823	4 200 610	881 213	17.34
2	14.24	3 777 934	3 051 863	726 071	19.22
3	28.37	3 268 179	2 733 211	534 968	16.37
4	29.67	5 805 271	4 696 644	1 108 627	19.10
5	34.58	759 282	621 849	137 433	18.10
6	37.63	1 695 763	1 346 408	349 355	20.60
7	41.61	1 055 077	664 465	390 612	37.02
8	46.09	1 147 225	678 133	469 092	40.89
9	53.79	319 081	86 614	232 467	72.86
10	58.55	429 276	173 518	255 758	59.58
11	60.44	81 184	12 930	68 254	84.07

$$\text{峰面积变化率} = \frac{A_{\text{大黄30\%乙醇提取液}} - A_{\text{共孵育残液}}}{A_{\text{大黄30\%乙醇提取液}}} \times 100\% \quad (1)$$

由表3可知,大黄30%乙醇提取液中有11个色谱峰,峰面积变化率大于15%,说明化学修饰L02肝细胞膜生物亲和材料对11种化学成分发生特异性吸附,包括4个蒽醌糖苷、2个未知成分(3号和6号色谱峰)及5个蒽醌苷元。1~4号色谱峰变化率虽较7~11号小,但实际峰面积差值远比7~11号大;造成其变化率小的原因在于:峰面积变化率计算公式中,大黄30%乙醇溶液峰面积在分母位置,峰面积大进而导致变化率小。结合峰面积变化率及峰面积差值,11种活性成分中1~4号色谱峰是主要的特异性成分,即芦荟大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷、大黄酸-8-O-β-D-葡萄糖苷、大黄酚-8-O-β-D-葡萄糖苷及未知成分1可作为潜在活性成分进行降血脂活性验证。

为进一步验证对解离液中特异性吸附成分进入细胞膜内部的推测,将化学修饰L02肝细胞膜生物亲和材料加1 mL PBS溶液,超声10 min(超声功率16 kHz),1 000 × g,4 ℃下离心10 min,收集上清液,HPLC色谱图见图4。

由图4可看出,采用超声法对化学修饰L02肝细胞膜生物亲和材料表面细胞膜进行破碎后,PBS溶液中出现被特异性吸附的11个化学成分色谱峰,证实上述推断合理性。

2.3 重复使用性能评价

化学修饰L02肝细胞膜生物亲和材料进行6次吸附实验后,细胞膜蛋白含量及Na⁺、K⁺-ATP酶活力结果见图5。

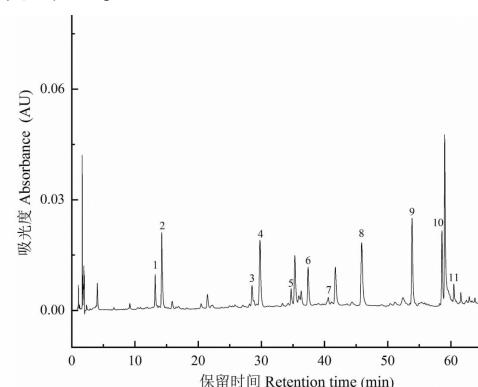


图4 化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料超声破碎液 HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC chromatogram of ultrasonic crushing solution of chemically modified L02 liver membrane bioaffinity material

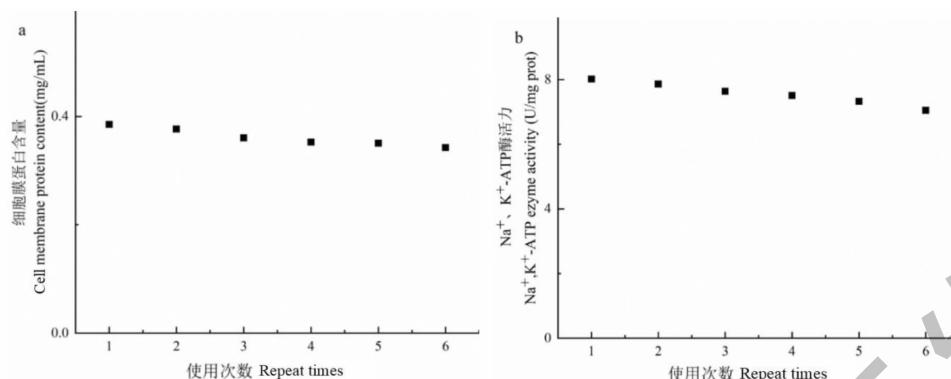


图 5 化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料重复使用性能评价

Fig. 5 Effect of the regeneration cycles on the chemically modified L02 liver membrane bioaffinity material

注:a. 细胞膜蛋白含量;b. $\text{Na}^+、\text{K}^+$ -ATP 酶活力。Note:a. Cell membrane protein content;b. $\text{Na}^+、\text{K}^+$ -ATP ezyme activity.

由图 5 可知,化学修饰 L02 肝细胞膜生物亲和材料重复使用 6 次,细胞膜蛋白含量下降 11.1%, $\text{Na}^+、\text{K}^+$ -ATP 酶活力下降 12.1%,两者均未发生显著降低,说明该材料重复使用性能良好。

3 结论

硅胶与 APTES、戊二醛依次发生交联、缩合反应,通过共价键将硅胶和细胞膜进行连接,制备 APTES 修饰硅胶为载体的 L02 细胞膜生物亲和材料,扫描电镜和红外光谱均证明制备成功。APTES 修饰 L02 细胞膜生物亲和材料对大黄 30% 乙醇提取液进行吸附,结果显示 11 个成分可被特异性结合;包括 4 个蒽醌糖苷、5 个蒽醌苷元及 2 个未知成分,其中芦荟大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷、大黄酸-8-O- β -D-葡萄糖苷、大黄酚-8-O- β -D-葡萄糖苷及未知成分 1 是主要的特异性成分,可作为潜在活性成分进行降血脂活性验证。但由于细胞膜表面靶点众多,本材料仅适用于降血脂活性成分的初步筛选;且后期需要利用 LC-MS/MS 对 2 个未知成分进行初步结构鉴定。相比于物理吸附 L02 细胞膜生物亲和材料,该材料通过引入化学共价键,一定程度上避免了细胞膜的脱落,延长使用次数,可用于大黄降血脂活性成分的快速筛选,该材料也可为其他降血脂活性成分的快速筛选提供参考。

参考文献

- Feng YS, Tong SS, Xu XM, et al. Progresses in screening active compounds from herbal medicine by affinity chromatography [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2015, 40:1032-1037.
- Wang JH, Wu XL, Wan QY, et al. Screening of active compo-

nents of *Cynanchum komarovii* Al. Iljiniski with analgesic effects using rat cerebral cortex cell membrane chromatography [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2016, 28:996-1000.

- ZHU Q. Cyto-membrane immobilized chromatography: hypothesis, method and application in traditional Chinese medicine [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2006, 22(1):8-13.
- Wang Y, Yang X, Xia PF, et al. Application of cell membrane chromatography coupled with mass spectrometry in screening of active ingredients of traditional Chinese medicines [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2020, 26(8):241-250.
- Ding X. Development and applications of new cell membrane chromatography covalently decorated by APTES [D]. Shanghai: The Second Military Medical University(第二军医大学), 2017.
- Ding X, Yan C, Yong FY, et al. Development of APTES-decorated HepG2 cancer stem cell membrane chromatography for screening active components from *Salvia miltiorrhiza* [J]. Anal Chem, 2016, 88:12081-12089.
- Nan HJ, Xu XD, Chen SL, et al. Research progress in *Rheum* plants [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2009, 21:690-701.
- Zhang Q, Chen YY, Yue SJ, et al. Research progress on processing history evolution as well as effect on chemical compositions and traditional pharmacological effects of *Rhei Radix et Rhizoma* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2021, 46:539-551.
- Jin LX, Jin LJ, Luan ZQ, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacology of rhubarb [J]. Inf Tradit Chin Med(中医药信息), 2020, 37(1):121-126.

- 10 Yu LY, Gong LH, Tang YQ, et al. Nonalcoholic fatty liver disease effect of emodin based on AMPK signaling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2020, 26(2):203-209.
- 11 Wang C, Dai XY, Gong LH, et al. Effects of emodin on lipid metabolism in zebrafish with hyperlipidemia [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31:1873-1879.
- 12 Gu JH. Study on effective substances of *Rheum palmatum L* in treating constipation and lowering blood lipid [D]. Lanzhou: Gansu College of Chinese Medicine(甘肃中医药学院), 2013.
- 13 Wang C, Hu NH, Yu LY, et al. Progress in lipid-lowering model research[J]. Chin J Comp Med(中国比较医学杂志), 2020, 30(4):121-130.
- 14 Ye FY, Yang RJ, Hua X, et al. Adsorption characteristics of rebaudioside A and stevioside on cross-linked poly(styrene-co-divinylbenzene) macroporous resins functionalized with chloromethyl, amino and phenylboronic acid groups[J]. Food Chem, 2014, 159:38-46.
- 15 Tan P, Zhang HZ, Zhang Q, et al. Simultaneous determination of 10 anthraquinone derivatives in *Rhei Radix et Rhizoma* based on UPLC [J]. Chin Tradit Herb Drug(中草药), 2018, 49:928-934.

载有青蒿素和原花青素的多功能纳米复合物通过调节脂质流入和胆固醇流出缓解动脉粥样硬化

结合纳米技术开发新剂型药物已成为提高免疫逃逸能力和增加治疗效率低的天然化合物局部药物浓度的有效策略。青蒿素和原花青素具有良好的抗动脉粥样硬化活性,但是两者药物体内清除速度快,生物利用度低,对动脉粥样硬化的治疗有限。

来自湖南大学的刘斌及其团队利用青蒿素和原花青素调整巨噬细胞的脂质流入和胆固醇流出的功能,即参与斑块进展的两个关键步骤,制备了用于治疗动脉粥样硬化的仿生膜包裹的普鲁士蓝纳米颗粒。体外实验结果表明,所制备的纳米复合物对 ROS 和 NO 有明显的清除作用,能够抑制 NF- κ B/NLRP3 途径从而抑制脂质的流入。同时,它们可以通过增强 AMPK/mTOR/自噬途径,并伴随着促进胆固醇外流,明显减少氧化脂蛋白的摄取和内化。体内研究表明,纳米复合物的生物相容性和免疫逃逸能力的提高使得药物在循环过程中的清除率较低,而在 ApoE^{-/-}小鼠模型的动脉粥样硬化斑块中的药物积累较高。更重要的是,无论是 8 周的低剂量治疗还是 1 周的高剂量治疗,青蒿素和原花青素共载的纳米复合物都显示出对 ApoE^{-/-}小鼠模型动脉粥样硬化的高治疗效果,表明该共载纳米复合物对动脉粥样硬化的靶向治疗很有前景。相关研究发表在《Journal of Controlled Release》杂志上。

胡乃华编译自:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016836592100674X>

原文标题:Artemisinin and procyanidins loaded multifunctional nanocomplexes alleviate atherosclerosis via simultaneously modulating lipid influx and cholesterol efflux