

葫芦茶叶抗过敏性哮喘组分分析

丁辉¹, 史丽颖^{1,2*}, 陈瑶¹, 卢轩^{1,2}, 冯宝民^{1,2}, 王永奇², 于大永^{1,2}

(1. 大连大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116622;

2. 大连大学 药物研究所, 辽宁 大连 116622)

[摘要] 目的: 研究葫芦茶抗过敏性哮喘的活性组分及化学成分。方法: 采用中、高压液相色谱法对葫芦茶叶提取物进行多组分富集, 采用无标记整合药理学方法筛选富集得到的组分对 GPR35 受体的激动活性, 应用 HPLC-TOF-MS 技术对活性组分的化学成分进行分析。结果: 葫芦茶叶的 95% 乙醇提取物经正庚烷-70% 甲醇萃取, 70% 甲醇萃取层经 C₁₈ 中压制备柱, 分别以 5%、70% 和 95% 的甲醇洗脱, 其中 70% 甲醇洗脱部分经 XAmide 高压制备色谱柱, 以甲醇-水洗脱, 按色谱峰收集流分, 共得到 10 个组分。GPR35 受体激动活性筛选结果显示组分 Fr4、Fr5、Fr6、Fr7、Fr9、Fr10 对 GPR35 受体有较强的激动活性, 同时对 GPR35 受体激动剂敏喘宁显示了脱敏活性, 由此推测上述组分为葫芦茶抗过敏性哮喘的活性组分。采用 HPLC-TOF-MS 技术对上述活性组分的化学成分进行了分析, 从中鉴定出乌索酸、儿茶素、山柰酚-3-O- α -鼠李糖基(1 \rightarrow 6)- β -葡萄糖苷、槲皮素-3-O- α -鼠李糖基(1 \rightarrow 6)- β -葡萄糖苷/槲皮素-3-O- α -鼠李糖基(1 \rightarrow 6)- β -半乳糖苷、间苯三酚-1-O- β -葡萄糖苷、槲皮素-3-O- β -葡萄糖苷、山柰酚-3-O- β -葡萄糖苷、山柰酚-3-O- β -半乳糖苷、triquetrumone E、triquetrumone F、山柰酚、胡萝卜苷、芹菜素, 共 12 个化合物。结论: 组分 Fr4、Fr5、Fr6、Fr7、Fr9、Fr10 为葫芦茶抗过敏性哮喘的有效组分, 从活性组分中检测到的 12 个化合物可能为葫芦茶抗过敏性哮喘的有效成分。

[关键词] 葫芦茶; 抗过敏性; 哮喘; GPR35; 成分分析

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)09-0030-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017090030

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170215.0944.026.html>

[网络出版时间] 2017-02-15 9:44

Analysis of Anti-allergic Asthma Constituents in *Tadehagi triquetrum* Leaves

DING Hui¹, SHI Li-ying^{1,2*}, CHEN Yao¹, LU Xuan^{1,2}, FENG Bao-min^{1,2},
WANG Yong-qi², YU Da-yong^{1,2}

(1. School of Life Sciences and Biotechnology, Dalian University, Dalian 116622, China;

2. Institute of Materia Medica, Dalian University, Dalian 116622, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-allergic asthma constituents in *Tadehagi triquetrum*. **Method:** The fractions were enriched from *T. triquetrum* by using medium or high pressure liquid chromatography; such active fractions as G protein-coupled receptor-35 (GPR35) agonists were screened out by using label-free dynamic mass redistribution assays; HPLC-TOF-MS was used to analyze the main components in active fractions. **Result:** The 95% ethanol extracts of leaves of *T. triquetrum* were extracted with *n*-heptane-70% methanol; 70% methanol extraction layer was eluted with 5%, 70% and 95% methanol through C₁₈ medium-pressure preparation column; among them, the part eluted with 70% methanol was eluted with methanol-water through XAmide high-pressure preparative chromatography column, and separated into 10 components based on chromatographic peaks.

[收稿日期] 20160525(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073012); 辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划项目(LJQ2013134)

[第一作者] 丁辉, 在读硕士, 从事天然活性物质的研究, Tel: 0411-87402107, E-mail: 924051506@qq.com

[通讯作者] * 史丽颖, 博士, 副教授, 从事天然活性物质的研究, Tel: 0411-87402107, E-mail: shiliying@dlu.edu.cn

The 10 fractions were enriched from *T. triquetrum*; fraction 4 , 5 , 6 , 7 , 9 and 10 exhibited strong activities against GPR35 receptor , suggesting the above components are anti-allergic asthma constituents of *T. triquetrum*. HPLC-TOF-MS was used to analyze the chemical constituents of the above components and identify 12 constituents , namely ursonic acid , catechinic acid , kaempferol-3-O- α -rhamanopyranosyl (1 \rightarrow 6) β -glucoside , quercetin-3-O- α -rhamanopyranosyl (1 \rightarrow 6) β -glucoside/quercetin-3-O- α -rhamanopyranosyl (1 \rightarrow 6) β -galactoside , phloroglucinol-3-O- β -galactoside , triquetrumone E , triquetrumone F , kaempferol , daucosterol and apigenin. **Conclusion:** Fraction 4 , 5 , 6 , 7 , 9 and 10 are active fractions , and the compounds identified from active fractions might be anti-allergic asthma constituents.

[Key words] *Tadehagi triquetrum*; anti-allergic; asthma; GPR35; component analysis

葫芦茶主产于广西、江西、广东、福建等地^[1]。具有清热解毒、消积利湿、杀虫防腐等功效,临床用于治疗感冒发热、咽喉肿痛、急性肾炎、黄疸性肝炎、肠炎、细菌性痢疾、妊娠呕吐等^[2-3]。现代药理学研究表明葫芦茶具有抗炎、抗菌、抗氧化等多种药理活性^[4-5]。化学研究表明葫芦茶叶主要含有黄酮、异黄酮、香豆素、多酚等成分^[6-13]。笔者在前期研究中发现葫芦茶具有较强的抗过敏性哮喘作用^[14-15],但其抗过敏性哮喘的有效成分及作用靶点还尚未阐明,解决这一问题的关键是构建作用靶标明确的药效物质基础评价体系。前期研究还发现,葫芦茶叶中有效成分易于提取且提取量高。随着小分子化合物库筛选和有潜力的内源性激动剂的发现,逐步证明 GPR35 受体与哮喘相关^[16-17],因此 GPR35 受体可能成为一个新颖的、有潜力的哮喘治疗的新靶标。基于无标记技术的整合药理学方法具有高通量(可以采用 384 孔生物感应器微型板测定),高内涵(能反映药物作用的多维属性),高灵敏(可以监测到药物在低浓度下引起的响应信号)的特性,前期研究中笔者应用无标记整合药理学方法建立了以 GPR35 受体为靶标的抗过敏性哮喘活性筛选模型,并从天然黄酮类化合物中发现了 3 个 GPR35 受体激动剂^[18-19],目前该模型已应用于葫芦茶叶多组分抗过敏性哮喘活性的筛选。本文拟通过对葫芦茶叶提取物进行多组分制备、多组分活性筛选及活性组分质谱表征的研究,进一步探讨葫芦茶抗过敏性哮喘的有效成分及作用靶点,为阐明葫芦茶抗过敏性哮喘的药效物质基础提供理论依据。

1 材料

葫芦茶药材采自广西平南县,标本经中科院昆明植物所裴盛基教授鉴定为豆科植物葫芦茶 *Tadehagi triquetrum* 的叶,标本现存于大连大学药物研究所(标本号 2013122101)。

敏喘宁(批号 Z0878)购自 Sigma-Aldrich 公司;

DMSO(批号 101K5580)购自 Bio Basic 公司; HBSS (批号 14175103)和 McCoy's 5A 培养液(批号 DY0324S0414L)购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Epic[®] 384 孔生物感应器微型板购自 Corning 公司; 人直肠癌 HT-29 细胞购自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库; XAmide 酰胺 HILIC 液相色谱柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m), C_{18} 烷基键合硅胶(60 μ m)购自浙江华谱公司; 甲醇、乙腈色谱纯,其他试剂分析纯。

IX71 型显微镜(日本 Olympus 公司), 5415R 型高速离心机(德国 Eppendorf 公司), CO_2 恒温培养箱(美国 Thermo 公司), Laborota 4000 型旋转蒸发仪(德国海道夫公司), Cheetahtm 快速纯化系统(北京 Agela 科技公司), 半制备型高效液相色谱仪(日本岛津公司), Sciex Triple TOF-4600 型质谱仪(美国 AB 公司), Milli-Q 型去离子水发生器(美国 Millipore 公司)。

2 方法与结果

2.1 葫芦茶叶组分制备 称取葫芦茶叶 1.0 kg, 粉碎后用 95% 乙醇 70 $^{\circ}C$ 加热回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液, 过滤后减压浓缩, 干燥得总提取物 110 g。

取总提取物 80 g, 溶于 70% 甲醇 2 L 中, 用等体积的正庚烷萃取 3 次, 合并萃取液得 70% 甲醇层和正庚烷层, 减压浓缩, 干燥得 70% 甲醇萃取物 55 g。

取上述 70% 甲醇萃取物 50 g, 经 C_{18} 中压制备柱, 分别以 5%、70%、95% 的甲醇洗脱, 分别合并洗脱液, 减压浓缩, 干燥得 70% 甲醇洗脱部分 26 g。取 70% 甲醇洗脱部分 25 g, 经 XAmide 高压制备柱, 流动相甲醇(A)-0.5% 甲酸水(B) 梯度洗脱(0~20 min, 80%~70% A, 20~30 min, 70%~5% A); 流速 10 mL \cdot min⁻¹, 进样量 200 μ L, 检测波长 254 nm, 按色谱峰收集流分, 共得到 10 个组分, Fr1~

Fr10 ,见图 1。

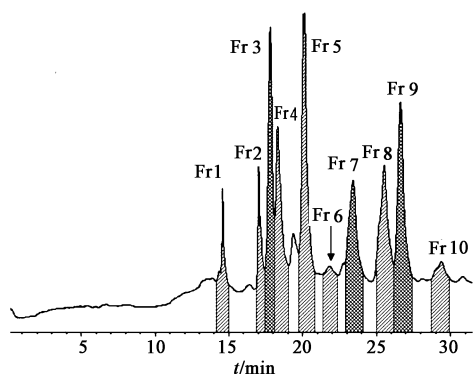


图 1 葫芦茶叶多组分制备色谱

Fig. 1 Preparative chromatogram of fractions from *Tadehagi triquetrum* leaves

2.2 葫芦茶叶组分抗过敏性哮喘活性筛选

2.2.1 实验原理

G 蛋白偶联受体 (G protein coupled receptors , GPCR) 是抗哮喘药物的重要靶标^[20] ,GPR35 受体作为 GPCR 家族的重要成员 ,在过敏性哮喘发病机制中发挥重要的作用 ,GPR35 受体激动剂的发现对于抗哮喘药物的研发具有重要意义^[16-21-22]。无标记细胞整合药理学技术 (cellular label-free integrative pharmacology , CLIP) 是将细胞受药物刺激产生的动态质量重置 (dynamic mass redistribution , DMR) 经谐振波导光栅生物传感器记录为可视化谱线 ,从而反映药物作用靶点和通路^[23-24]。本研究采用 HT-29 细胞培养 ,以其高表达的 GPR35 受体为靶标 ,通过无标记细胞靶点药理学技术筛选了葫芦茶叶组分的 GPR35 受体激动活性。

2.2.2 实验方法

GPR35 受体激动活性筛选参照文献 [18-25] 的方法。HT-29 细胞以 3.2×10^4 个/孔的密度接种到 Epic[®] 384 孔生物感应器微型板中 ,置于 37 °C 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 h。检测前用 HBSS 缓冲液洗 2 次 ,然后每孔加 HBSS 缓冲液 30 μL ,置于 Epic[®] 系统上平衡孵育 1 h ,平衡后在 Epic[®] 系统上建立 1 个 2 min 的基线。对于激动分析 ,加入待测组分 (质量浓度 100 ,50 ,25 mg · L⁻¹) 或对照溶液 10 μL ,继续监测 1 h。通过监测各组分引起的 DMR 响应信号来评价各组分对 GPR35 受体的激动活性。对于脱敏分析 ,加入待测组分 10 μL 预处理 HT-29 细胞 1 h ,然后加入 1 μmol · L⁻¹ 敏喘宁 10 μL 继续监测 1 h。通过监测各组分预处理后敏喘宁引起的 DMR 信号来评价各组分对敏喘宁的脱敏作用 ,即各组分对 GPR35 受体的亲和力。

2.2.3 数据处理

DMR 数据由 Epic Imager 软件 (美国康宁公司) 记录 ,并经 Imager Beta 3.7 软件

(美国康宁公司) 处理得到。采用 Microsoft Excel 2010 和 Graph Pad Prism 软件进行统计分析。所有的 DMR 信号都经空白校正得到。

2.2.4 实验结果

实时监测葫芦茶各叶组分在 HT-29 细胞上的 DMR 响应 ,取 60 min 内最大 DMR 响应值作图。在 100 ,50 ,25 mg · L⁻¹ 质量浓度下各组分均产生不同程度的 DMR 响应 ,其中在 25 mg · L⁻¹ 质量浓度下组分 Fr4 ,Fr5 ,Fr6 ,Fr7 ,Fr9 和 Fr10 在 HT-29 细胞上引起的最大 DMR 响应均在 300 pm 以上 ,> 1 μmol · L⁻¹ 敏喘宁引起的最大 DMR 响应 (240 pm)。见图 2。

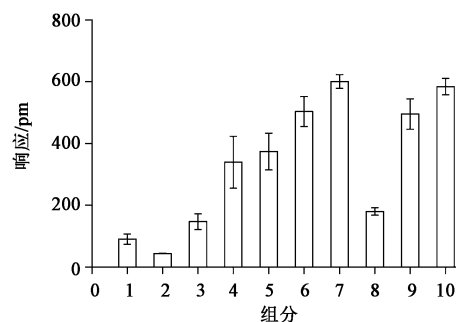


图 2 葫芦茶叶各组分 (25 mg · L⁻¹) 在 HT29 细胞上引起的最大 DMR 响应 ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

Fig. 2 DMR response of fractions (25 mg · L⁻¹) from *Tadehagi triquetrum* leaves HT-29 cells ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

为验证活性组分在 HT-29 细胞上引起的 DMR 响应是由激动 GPR35 受体引起的 ,以上述组分对 HT-29 细胞预处理 1 h 后 ,重新建立基线 ,再加入 1 μmol · L⁻¹ 的敏喘宁 ,实时监测敏喘宁在 HT-29 细胞上的 DMR 响应 ,取 60 min 内最大 DMR 响应值作图。结果表明 ,以质量浓度 100 ,50 ,25 mg · L⁻¹ 的各组分预处理 HT-29 细胞后 ,对敏喘宁均产生脱敏作用 ,且呈剂量依赖关系 ,其中 100 mg · L⁻¹ 的组分 Fr4 ,Fr5 ,Fr6 ,Fr7 ,Fr9 和 Fr10 预处理 HT-29 细胞后 ,对敏喘宁产生的脱敏作用较强。这说明活性组分与敏喘宁竞争结合同一受体——GPR35 受体 ,即活性组分在 HT-29 细胞上引起的 DMR 响应是由激动 GPR35 受体引起的。见图 3 A。

2.3 活性组分质谱表征 为明确活性组分的化学组成 ,笔者采用 HPLC-TOF-MS 技术对活性组分 Fr4 ,Fr5 ,Fr6 ,Fr7 ,Fr9 ,Fr10 的化学成分进行了分析。

2.3.1 样品配制 分别称取活性组分 ,用甲醇配成质量浓度为 150 mg · L⁻¹ 的溶液 ,0.45 μm 微孔滤膜滤过后待用。

2.3.2 色谱与质谱条件 选用 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 反相色谱柱 ,流动相乙腈 (A) -0.5% 甲酸水 (B)

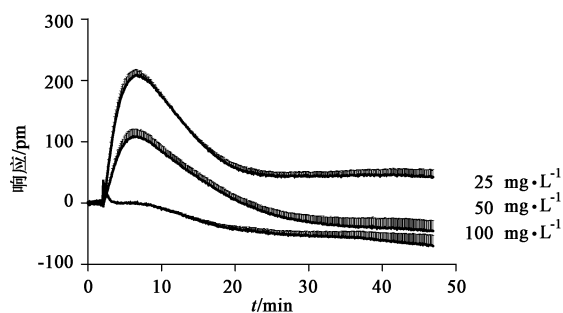


图 3 组分 5 预处理 HT29 细胞后敏喘宁在 HT-29 细胞上的 DMR 响应曲线($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.3 Real time DMR dose responses of Zaprinast on HT-29 cells after treated with Fr5 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

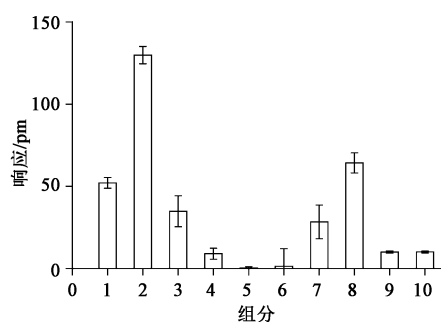


图 4 葫芦茶叶各组分($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 预处理 HT29 细胞后敏喘宁在 HT-29 细胞上引起的最大 DMR 响应($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.4 DMR response of Zaprinast on HT-29 cells after treated with the fractions ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) from *Tadehagi triquetrum* leaves ($\bar{x} \pm s, n=3$)

梯度洗脱 (0 ~ 40 min ,10% ~ 60% A ,40 ~ 45 min , 60% ~ 95% A) ; 流速 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 $40 \text{ }^\circ\text{C}$,进样量 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 。

表 1 从葫芦茶叶组分中鉴定的化学成分

Table1 Constituents identified from *Tadehagi triquetrum* leaves

No.	组分	一级质谱	二级质谱	化合物
1	Fr4	457	331	乌索酸
2	Fr4	291	273 , 247 , 231 , 207 , 181	儿茶素
3	Fr5	595	449 , 287	山柰酚-3-O- α -鼠李糖基(1 \rightarrow 6)- β -葡萄糖苷
4	Fr6	611	465 , 303	槲皮素-3-O- α -鼠李糖基(1 \rightarrow 6)- β -葡萄糖苷 或槲皮素-3-O- α -鼠李糖基(1 \rightarrow 6)- β -半乳糖苷
5	Fr6	289	127	间苯三酚-1-O- β -葡萄糖苷
6	Fr6	465	303	槲皮素-3-O- β -葡萄糖苷
7	Fr7	449	287	山柰酚-3-O- β -葡萄糖苷或山柰酚-3-O- β -半乳糖苷
8	Fr7	463	339 , 228	triquetrumone E
9	Fr7	385	340 , 322 , 227	triquetrumone F
10	Fr7	287	269 , 259 , 243 , 231 , 171	山柰酚
11	Fr9	577	510 , 413 , 367 , 300	胡萝卜苷
12	Fr10	271	227 , 183	芹菜素

采用 ESI 离子源 ,正离子模式 ,电离电压 4.5 kV ,雾化气 345 kPa ,辅助加热气 345 kPa ,辅助加热气温度 $550 \text{ }^\circ\text{C}$,检测模式为飞行时间全扫描质谱和二级质谱(TOF MS IDA MS/MS) 模式 ,去簇电压 80 V ,MS/MS 碰撞能量 35 eV ,扩展碰撞能量 15 eV ,TOF-MS 扫描范围为 $m/z 100 \sim 1\ 000$,TOF-MS/MS扫描范围为 $m/z 100 \sim 1\ 000$ 。

2.3.3 数据处理 采用 Analyst TF1.6 分析软件对质谱测定结果进行处理。

2.3.4 实验结果 通过对化合物质谱裂解信息的研究 ,同时结合文献 [6-13] ,对活性组分 Fr4 ,Fr5 ,Fr6 ,Fr7 ,Fr9 ,Fr10 中的主要化学成分进行了结构推测 ,推测出其中的 12 个化合物 ,见表 1。以其中的槲皮素和山柰酚为母核的黄酮苷类成分为例来说明鉴定过程。存在母离子 $[M + H]^+$ ($m/z 449$) ,碎片离子 $[M + H - \text{Glu}]^+$ 或 $[M + H - \text{Gal}]^+$ ($m/z 287$) ,即母离子脱去 1 个葡萄糖基或半乳糖基产生山柰酚碎片离子 ,推测此化合物为山柰酚-3-O- β -葡萄糖苷或山柰酚-3-O- β -半乳糖苷 ,见图 5。存在母离子 $[M + H]^+$ ($m/z 595$) ,碎片离子 $[M + H - \text{Rha}]^+$ ($m/z 449$) , $[M + H - \text{Rha} - \text{Glu}]^+$ ($m/z 287$) ,即母离子先脱去 1 个鼠李糖基 ,再脱去 1 个葡萄糖基 ,产生山柰酚碎片离子 ,结合文献推测此化合物为山柰酚-3-O- α -鼠李糖基(1 \rightarrow 6)- β -葡萄糖苷 ,见图 6。存在母离子 $[M + H]^+$ ($m/z 465$) ,碎片离子 $[M + H - \text{Glu}]^+$ 或 $[M + H - \text{Gal}]^+$ ($m/z 303$) ,即母离子脱去 1 个葡萄糖基或半乳糖基产生槲皮素碎片离子 ,结合文献报道推测此化合物为槲皮素-3-O- β -葡萄糖

苷,见图 7。

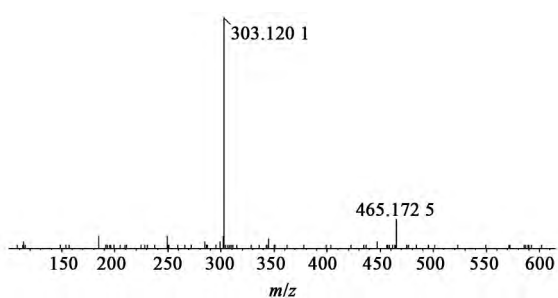


图 5 山柰酚-3-O-β-葡萄糖苷/山柰酚-3-O-β-半乳糖苷的质谱
Fig. 5 MS/MS spectrum of kaempferol 3-O-β-glucoside/kaempferol 3-O-β-galactoside

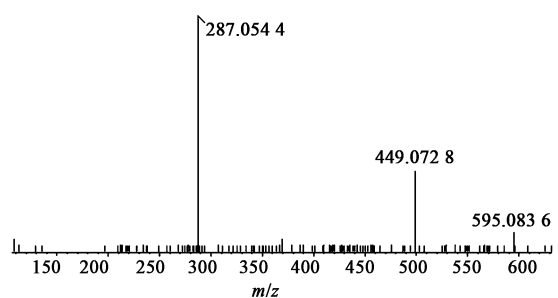


图 6 山柰酚-3-O-α-鼠李糖基(1→6)-β-葡萄糖苷质谱
Fig. 6 MS/MS spectrum of kaempferol 3-O-α-rhamnosyl-(1→6)-β-glucopyranoside

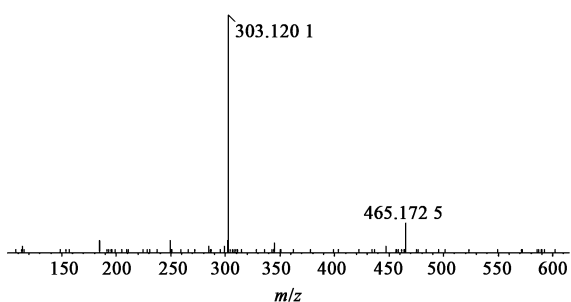


图 7 槲皮素-3-O-β-葡萄糖苷的质谱
Fig. 7 MS/MS spectrum of quercetin-3-O-β-glucoside

3 结论

本研究通过采用液相色谱法,对葫芦茶叶提取物进行了多组分富集,富集得到了 10 个组分。采用无标记整合药理学方法筛选了富集得到的 10 个组分对 GPR35 受体的激动活性,其中有 6 个组分显示了较强的 GPR35 受体激动活性,被确定为葫芦茶抗过敏性哮喘的有效组分。进而应用 HPLC-TOF-MS 技术对上述组分的化学成分进行了分析,从中鉴定了 12 个化合物,主要为黄酮类成分,提示其可能为葫芦茶抗过敏性哮喘的有效成分。

4 讨论

根据疾病治疗指南推荐,目前哮喘治疗的一线药物为吸入性糖皮质激素、短效或长效 β₂-肾上腺受

体激动剂^[26]。此外, M 受体阻滞剂、茶碱类药物、抗白三烯药物、抗组胺药物、色甘酸钠类药物也是哮喘治疗常规类药物^[20,26]。其中肥大细胞膜稳定剂,如色甘酸钠,通过抑制肥大细胞脱颗粒而抑制炎性介质的释放,最近研究证实色甘酸钠为 GPR35 受体的激动剂^[21]。目前 GPR35 受体已经成为哮喘治疗的新靶标^[21-22],因此本研究中以葫芦茶各组分对 GPR35 受体的激动活性为指标来评价各组分的抗过敏性哮喘活性。

无标记整合药理学方法是通过采用无标记技术(Epic label-free technology)监测探针分子/药物作用于活细胞后引发细胞内部物质动态的变化过程来反映药物作用的靶点和通路。Epic 系统由共振波导光栅读板仪和标准微量滴定板组成。读板仪的检测器系统利用集成光纤测量入射光的波长移位,该移位是由药物分子刺激细胞引发配体结合、受体激活、蛋白募集、受体内化和再循环、第二信使变化、细胞骨架重塑、基因表达、细胞黏附等而引起的,也就是说该位移反映的是活细胞内部动态的物质再分布。目前该方法已经成功用于 β₂ 受体^[27], M3 受体^[28], H1 受体^[29], GPR35 受体^[30] 等多个 G 蛋白偶联受体的靶点药理学研究。本研究成功将无标记整合药理学方法应用于含有多成分的复杂组分的活性筛选,为复杂组分的活性追踪提供了可借鉴的方法。

本研究采用活性评价与质谱解析相结合的方法,首先采用无标记整合药理学技术研究了葫芦茶组分对 GPR35 受体的激动活性,进而采用 HPLC-TOF-MS 技术分析了活性组分中的化学成分,为阐明葫芦茶叶抗过敏性哮喘的作用物质基础及作用机制奠定了基础,而且为作用靶标明确的中药活性成分发现提供了新的思路和方法。

[参考文献]

- [1] 林艳芳,依专,赵应红. 中国傣医药彩色图谱[M]. 昆明:云南民族出版社,2003:641.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第十一卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:661-663.
- [3] 南京中医药大学. 中药大辞典. 下册[M]. 上海:上海科学技术出版社,2000:2306.
- [4] 相鲁闽,翁翠萍. 民间疗法八则[J]. 中国民间疗法,2002,10(1):58-59.
- [5] 田小华. 葫芦茶治疗婴儿脓疱疮 50 例观察[J]. 中国社区医师:医学专业,2013,15(1):203-204.
- [6] 周旭东,吕晓超,史丽颖,等. 葫芦茶地上部分化学成分的研究[J]. 广西植物,2013,33(4):575-578.

- [7] 金燕,林娜,任少琳. 葫芦茶化学成分的研究[J]. 中国药物化学杂志, 2015, 25(4): 303-305.
- [8] 文东旭,郑学忠,史剑侠,等. 葫芦茶化学成分的研究(I) [J]. 中草药, 1999, 30(4): 252-253.
- [9] 文东旭,陆敏仪,唐人九,等. 葫芦茶化学成分的研究(II) [J]. 中草药, 2000, 31(1): 5-7.
- [10] 杨其盖,梁锡辉,王亚平. 葫芦茶化学成分的研究(I) [J]. J Integr Plant Biol, 1989, 31(2): 128-131.
- [11] 吕华冲,何蔚珩,杨其盖,等. 葫芦茶化学成分的研究(II) [J]. 中草药, 1995, 26(4): 180.
- [12] XIANG W, LI R T, MAO Y L, et al. Four new prenylated isoflavonoids in *Tadehagi triquetrum* [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(2): 267-271.
- [13] ZHANG R T, CHENG G G, FENG T, et al. Four new isoflavanones from *Tadehagi triquetrum* [J]. Nat Prod Bioprospect, 2011, 1(3): 121-123.
- [14] 于大永,周旭东,史丽颖,等. 葫芦茶地上部分抗 IgE 介导 I 型过敏反应的研究[J]. 中药材, 2010, 33(11): 1785-1787.
- [15] 周旭东,史丽颖,于大永,等. 葫芦茶抗 IgE 介导 I 型过敏有效部位的研究[J]. 中南药学, 2011, 9(1): 35-38.
- [16] Taniguchi Y, Tonai-Kachi H, Shinjo K. Zaprinast, a well-known cyclic guanosine monophosphate specific phosphodiesterase inhibitor, is an agonist for GPR35 [J]. FEBS Lett, 2006, 580(21): 5003-5008.
- [17] WANG J, Simonavicius N, WU X, et al. Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35 [J]. J Biol Chem, 2006, 281(31): 22021-22028.
- [18] 侯滔,史丽颖,何举,等. 两个黄酮类化合物对 GPR35 受体激动活性的研究[J]. 中国科学: 生命科学, 2016, 46(2): 192-198.
- [19] 侯滔,丁辉,史丽颖,等. 羟基茜草素对 GPR35 受体激动活性的研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(7): 1414-1418.
- [20] Martinez F D, Vercelli D. Asthma [J]. Lancet, 2013, 382(9901): 1360-1372.
- [21] YANG Y, LU J Y L, WU X, et al. G-protein-coupled receptor 35 is a target of the asthma drugs cromolyn disodium and nedocromil sodium [J]. Pharmacology, 2010, 86(1): 1-5.
- [22] Mac Kenzie A E, Lappin J E, Taylor D L, et al. GPR35 as a novel therapeutic target [J]. Front Endocrinol: Lausanne, 2011, 2(2): 68.
- [23] FANG Y, Ferrie A M, Fontaine N H, et al. Resonant waveguide grating biosensor for living cell sensing [J]. Biophys J, 2006, 91(5): 1925-1940.
- [24] FANG Y. The development of label-free cellular assays for drug discovery [J]. Expert Opin Drug Dis, 2011, 6(12): 1285-1298.
- [25] DENG H, HU H, LING S, et al. Discovery of natural phenols as G protein-coupled receptor-35 (GPR35) agonists [J]. ACS Med Chem Lett, 2012, 3(2): 165-169.
- [26] Holgate S T, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma [J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(3): 218-230.
- [27] FANG Y, Ferrie A M. Label-free optical biosensor for ligand-directed functional selectivity acting on beta(2) adrenoceptor in living cells [J]. FEBS Lett 2008, 582(5): 558-564.
- [28] DENG H, WANG C, SU M, et al. Probing biochemical mechanisms of action of muscarinic M3 receptor antagonists with label-free whole cell assays [J]. Anal Chem 2012, 84(19): 8232-8239.
- [29] Tran E, YE F. Duplexed label-free G protein-coupled receptor assays for high-throughput screening [J]. J Biomol Screen 2008, 13(10): 975-985.
- [30] HU H, DENG H, FANG Y. Label-free phenotypic profiling identified *D*-luciferin as a GPR35 agonist [J]. PLoS One, 2012, 7(4): e34934.

[责任编辑 顾雪竹]