论文

两个黄酮类化合物对 GPR35 受体激动活性的研究

侯滔^①, 史丽颖^{①*}, 何肇^②, 王平^②, 王纪霞^②, 魏来^②, 张秀莉^{②*}, 梁鑫淼^②

① 大连大学生命科学与技术学院, 大连 116622;

② 中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023

* 联系人, E-mail: shiliying@dlu.edu.cn; zhangxiuli@dicp.ac.cn

收稿日期: 2015-07-16; 接受日期: 2015-09-09

国家自然科学基金(批准号: 81473436)和中国科学院国际合作局对外合作重点项目(批准号: 121421KYSB20130013)资助

摘要 GPR35 受体是 G 蛋白偶联受体家族中的孤儿受体, 它的很多生物学功能还不是很清楚. 寻找发现 GPR35 受体的配体对于 GPR35 受体的生物学及药理学研究具有重要意义. 本研究利用无标记细胞靶点药理学筛选技术, 系统研究了天然黄酮类化合物对 GPR35 受体的激动活性, 新发现了草质素和异补骨脂二氢黄酮具有 GPR35 受体激动活性, 其中草质素 $EC_{50} = (1.452 \pm 0.093) \mu\text{mol/L}$, 是最具药物开发潜力的一个 GPR35 受体激动剂.

关键词 无标记细胞筛选技术, GPR35 受体, 整合药理学, 黄酮类化合物, 激动剂

天然产物已经成为药物发现的一个重要来源^[1]. 存在于大量植物中的次生代谢产物黄酮类化合物, 种类繁多、结构多样, 表现出抗肿瘤、抗心血管疾病、消炎、抗过敏、抗氧化、抗衰老、抗骨质疏松、镇痛和免疫调节等活性^[2-4].

GPR35 受体是 G 蛋白偶联受体家族中的一个孤儿受体, 其生物学功能还不是很清楚^[5]. GPR35 受体在包括白细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、T 细胞、树突细胞等免疫细胞, 胰腺、小肠、结肠和脾脏等各种组织中表达^[6,7]. 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 受体可能与疼痛^[8,9]、高血压^[10]、冠状动脉疾病^[11]、早发性炎症性疾病^[12]、炎症^[13,14]和哮喘^[15,16]等疾病相关, 因此 GPR35 受体非常有可能成为一个新颖的、有潜力

的治疗靶标.

在阐明 GPR35 受体的生物学和药理学研究中发现多种化学类型的 GPR35 受体激动剂^[6,15-26], 其中包括色氨酸代谢物犬尿喹啉酸^[7]、磷酸二酯酶-5 抑制剂敏喘宁^[6]、溶血磷脂酸受体激动剂 2-油酰磷脂酸 (2-oleoyl lysophosphatidic acid, 2-oleoyl LPA)^[17]和各种酪氨酸代谢产物包括迷迭香酸、5,6-二羟基吲哚-2-羧酸 (5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid, DHICA)^[25,27,28]. 然而大部分配体对于激活 GPR35 受体只表现出一个中等的潜势^[29]. 因此, 寻找新的、有潜力的配体对于阐明 GPR35 受体的生物学、药理学功能和发展针对 GPR35 受体的药物是非常必要的.

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

引用格式: 侯滔, 史丽颖, 何肇, 等. 两个黄酮类化合物对 GPR35 受体激动活性的研究. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 192-198

Hou T, Shi L Y, He J, et al. Discovery of two flavonoids as agonists of G protein-coupled receptor-35. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 192-198, doi: 10.1360/N052015-00032

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, 其具有无标记、无伤害、高通量、高灵敏度等特点^[30-32]. 由于细胞 DMR 的普遍性, CLIP 技术既可以使用转基因工程改造的细胞模型, 也可以使用无标记的原生细胞模型. 因此无标记细胞整合药理学技术可以用于化合物的作用靶点发现, 还可以反映化合物的多靶点、多通路和网络作用的特征^[33]. 此外, CLIP 技术巧妙地设计了阵列光学生物传感器, 实现了 384 孔板的高通量筛选, 已被用于药物的发现^[33-39]与受体生物学^[16,19-22,27-28,40]的研究, 特别是在 GPR35 配体的研究中应用非常广泛^[16,20-22,25,27-28,40]. 为了从天然产物中发现 GPR35 受体激动剂, 本研究应用 CLIP 技术筛选了 37 个黄酮类化合物对 GPR35 受体的激动活性, 首次发现草质素和异补骨脂二氢黄酮为 GPR35 受体激动剂.

1 材料与方法

1.1 化合物和试剂

千层纸素 A(1)、野黄芩素(2)、草质素(3)、7,8-二羟基黄酮(4)、5,6-二羟基黄酮(5)、杨梅苷(6)、杨梅素(7)、木犀草素(8)、桑色素(9)、木犀草苷(10)、5,7-二羟基黄酮(11)、山奈酚(12)、补骨脂二氢黄酮甲醚(13)、异补骨脂二氢黄酮(14)、补骨脂二氢黄酮(15)、高良姜素(16)、橙皮素(17)、花旗松素(18)、芹菜素(19)、3',4'-二羟基黄酮(20)、7-甲氧基黄芩素(21)、黄芩素(22)、哌啶醇黄芩素(23)、二氢杨梅素(24)、野黄芩苷(25)、汉黄芩苷(26)、汉黄芩素(27)、槲皮素(28)、千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷(29)、黄芩苷(30)、3-羟基黄酮(31)、3-甲氧基黄酮(32)、3',4',7-三羟基黄酮(33)、4',7-二羟基黄酮(34)、6,7-二甲氧基黄芩素(35)、二甲胺黄芩素(36)、吡咯烷黄芩素(37)、黄芩素哌啶醇甲磺酸盐(38)来源于中国科学院大连化学物理研究所药用资源开发研究组; 敏喘宁(货号: Z0878)购自 Sigma(美国); ML145 购自 Tocris(英国); 硫酸链霉素、氨苄青霉素和 DMSO 购自 Bio Basic 公司(美国); 汉克斯平衡盐溶液(Hanks balanced salt solution, HBSS)、胎牛血清和 McCoy's 5A 培养液购自 Gibco 公司(美国); 二氧化碳恒温箱购自 Thermo 公司(美国); Epic[®] 384 孔生物感应器微型板购自 Corning 公司(美国).

1.2 细胞培养

人结肠癌细胞(HT-29)从中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库获得. HT-29 细胞用含有 10% 的胎牛血清、100 U/mL 氨苄青霉素、100 μ g/mL 硫酸链霉素的 McCoy's 5A 培养液在 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 的细胞培养箱中培养.

1.3 活性筛选实验

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 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 h. 在检测之前用 HBSS 缓冲液洗 2 次, 然后每孔加 30 μ L HBSS 缓冲液置于 Epic[®] 系统上平衡孵育 1 h. 对于化合物激活活性筛选, 平衡后首先在 Epic[®] 系统上建立一个 2 min 的基线, 然后将待测化合物加入培养 HT-29 细胞的 Epic[®] 384 孔生物感应器微型板中, 继续监测 1 h. 对于脱敏分析, 加入 10 μ L 待测化合物预处理 HT-29 细胞 1 h, 然后加入 10 μ L 的敏喘宁继续监测 1 h. 对于拮抗分析, 加入 10 μ L 的 ML145 预处理 HT-29 细胞 1 h, 然后加入 10 μ L 的待测化合物继续监测 1 h.

1.4 数据分析

DMR 数据由 Epic Imager 软件(康宁公司, 美国)记录, 并经 Imager Beta 3.7 软件(康宁公司, 美国)处理得到. 采用 Microsoft Excel 2010 和 GraphPad Prism 软件进行统计分析. 所有的 DMR 信号都经空白校正得到. 正文部分描述的 EC₅₀(半最大效应浓度)和 IC₅₀(半抑制浓度)基于加入化合物 40 min 内最大 DMR 信号计算得到. 所有数据来自 2 次独立实验, 每次 4 次重复完成.

2 结果与讨论

2.1 黄酮类化合物对 GPR35 受体激动活性筛选

本研究采用无标记细胞靶点药理学筛选技术对 38 个黄酮类化合物进行筛选. 敏喘宁(zaprinast)是一个已知的 GPR35 受体激动剂^[6], 以其作为阳性对照. 首先, 实时监测 10 μ mol/L 的黄酮类化合物在 HT-29 细胞上的 DMR 信号, 取 40 min 内最大 DMR 信号值作图. 如图 1 所示, 草质素(herbacetin)、异补骨脂二氢黄酮(isobavachin)、杨梅素(myricetin)、桑色素(morin)、黄芩素(baicalein)、槲皮素(quercetin)、木犀

图1 38个黄酮类化合物(10 $\mu\text{mol/L}$)和敏喘宁(1 $\mu\text{mol/L}$)在 HT29 细胞上引起的最大 DMR 响应

草素(luteolin)的 DMR 信号在敏喘宁(1 $\mu\text{mol/L}$)的 DMR 信号的 30%以上, 其中杨梅素、桑色素、黄芩素、槲皮素、木犀草素已被报道为 GPR35 受体的激动剂^[22], 而草质素和异补骨脂二氢黄酮对 GPR35 受体的激动作用尚未见报道, 因此对草质素和异补骨脂二氢黄酮以及已知天然 GPR35 激动剂桑色素的激动活性进行了研究。

2.2 草质素和异补骨脂二氢黄酮的 GPR35 受体激动活性验证

下文将通过激动分析、脱敏分析和拮抗分析 3

个方面来验证草质素和异补骨脂二氢黄酮对 GPR35 受体的激动活性。

(1) 激动分析. 敏喘宁、桑色素、草质素和异补骨脂二氢黄酮的 DMR 剂量曲线: 取 10 μL 的敏喘宁(最高工作浓度 16 $\mu\text{mol/L}$ 、2 倍稀释、14 个浓度梯度)、桑色素(最高工作浓度 80 $\mu\text{mol/L}$ 、2 倍稀释、14 个浓度梯度)、草质素(最高工作浓度 31.25 $\mu\text{mol/L}$ 、2 倍稀释、14 个浓度梯度)和异补骨脂二氢黄酮(最高工作浓度为 250 $\mu\text{mol/L}$ 、2 倍稀释、14 个浓度梯度)和加入已接种 HT-29 细胞的 Epic[®] 384 孔生物感应器微型板中监测 1 h(图 2)。由图可以看出, 草质素和异补骨脂二氢黄酮的 DMR 信号曲线类型与敏喘宁(图 2C)一致, 而且两者的 DMR 信号随着剂量的升高而增加, 草质素在 15.6 $\mu\text{mol/L}$ 时, DMR 信号达峰值, 异补骨脂二氢黄酮在最高浓度 250 $\mu\text{mol/L}$ 时仍没有达到峰值, 但由于溶解度限制, 并没有进行更高浓度的测试; 最后, 以最大 DMR 值与样品浓度作图, 符合 S 型曲线(图 2D), 并得到两者的 EC_{50} 值分别为(1.452 $\pm$ 0.093)和(74.727 $\pm$ 6.150) $\mu\text{mol/L}$ 。上述结果说明草质素和异补骨脂二氢黄酮可能是 GPR35 受体的激动剂。与 Deng 等人^[22]报道的其他黄酮类 GPR35 激动剂相比,

图2 化合物在 HT29 细胞上的 DMR 信号及量效曲线

A: 草质素的 DMR 响应曲线; B: 异补骨脂二氢黄酮的 DMR 响应曲线; C: 敏喘宁的 DMR 响应曲线; D: 敏喘宁、桑色素、草质素和异补骨脂二氢黄酮的量效关系曲线。灰线为标准差($n=4$)

草质素的 EC_{50} 值只略低于桑色素, 是一个对 GPR35 受体有较强激动活性的天然黄酮类化合物. 已知 GPR35 激动剂敏喘宁和桑色素的 EC_{50} 值分别为 (0.122 ± 0.006) 和 (2.508 ± 0.421) $\mu\text{mol/L}$, 与文献[22]报道相近.

(2) 脱敏分析. 分别取 10 μL 草质素(最高工作浓度 31.25 $\mu\text{mol/L}$ 、2 倍稀释、14 个浓度梯度)、异补骨脂二氢黄酮(最高工作浓度为 250 $\mu\text{mol/L}$ 、2 倍稀释、14 个浓度梯度)和桑色素(最高工作浓度 80 $\mu\text{mol/L}$ 、2 倍稀释、14 个浓度梯度)处理 HT29 细胞 1 h 后, 再加入 10 μL 的敏喘宁(工作浓度 1 $\mu\text{mol/L}$)继续监测 1 h, 其 DMR 曲线如图 3 所示. 敏喘宁的 DMR 信号随着草质素(图 3A)和异补骨脂二氢黄酮(图 3B)浓度的增加而降低, 说明草质素和异补骨脂二氢黄酮与敏喘宁竞争同一结合位点——GPR35 受体. 草质素在 15.6 $\mu\text{mol/L}$ 、异补骨脂二氢黄酮在 250 $\mu\text{mol/L}$ 时, 1 $\mu\text{mol/L}$ 的敏喘宁不引起 DMR 响应, 说明此时 GPR35 受体的结合位点完全被占据. 草质素和异补骨脂二氢黄酮的预处理剂量与脱敏后敏喘宁的 DMR 信号呈反 S 型曲线(图 3C), 这进一步说明草质素和异补骨脂二氢黄酮可能是 GPR35 受体的激动剂, 它们对 1 $\mu\text{mol/L}$ 敏喘宁脱敏的 IC_{50} 值分别为 (0.614 ± 0.041)

和 (65.533 ± 3.007) $\mu\text{mol/L}$. 与 Deng 等人[22]报道的其他黄酮类化合物 GPR35 激动剂相比, 草质素对敏喘宁的脱敏作用最强.

(3) 拮抗分析. 已知 ML145 是 GPR35 受体的拮抗剂[41]. 取 10 μL 的 ML145(最高工作浓度 8 $\mu\text{mol/L}$ 、2 倍稀释、14 个浓度梯度)预处理 HT29 细胞 1 h, 然后加入 EC_{100} 的草质素(15.6 $\mu\text{mol/L}$)、异补骨脂二氢黄酮(200 $\mu\text{mol/L}$)和桑色素(64 $\mu\text{mol/L}$)继续监测 1 h(图 4). 随着 ML145 浓度的增加, 草质素(图 4A)和异补骨脂二氢黄酮(图 4B)的 DMR 响应信号逐渐降低, 且呈剂量依赖性, IC_{50} 值分别为 (817.8 ± 49) 和 (320.4 ± 57) nmol/L , 以草质素和异补骨脂二氢黄酮的 DMR 信号对 ML145 的浓度作图, 得反 S 型曲线(图 4C), 说明 ML145 能够拮抗草质素和异补骨脂二氢黄酮的活性.

上述结果表明, 草质素和异补骨脂二氢黄酮在 HT-29 细胞上产生的 DMR 信号是通过激动 GPR35 受体而产生的, 因此推断草质素和异补骨脂二氢黄酮是 GPR35 受体的激动剂.

量效关系结果表明, 草质素的 GPR35 激动活性强于桑色素, 桑色素强于异补骨脂二氢黄酮, 结合文献报道[22], 推测天然黄酮类化合物 GPR35 受体激动

图 3 化合物预处理剂量与敏喘宁的 DMR 信号及量效曲线

不同剂量的(A)草质素和(B)异补骨脂二氢黄酮处理 HT-29 细胞 1 h 后, 1 $\mu\text{mol/L}$ 敏喘宁的 DMR 响应曲线; C: 草质素、异补骨脂二氢黄酮和桑色素预处理剂量与 1 $\mu\text{mol/L}$ 敏喘宁引起的 DMR 信号的量效关系曲线

图4 ML145 预处理剂量与化合物的 DMR 信号及量效曲线

不同剂量的 ML145 处理 HT-29 细胞 1 h 后, (A)草质素和(B)异补骨脂二氢黄酮的 DMR 响应曲线; C: ML145 预处理剂量与 15.6 $\mu\text{mol/L}$ 草质素、200 $\mu\text{mol/L}$ 异补骨脂二氢黄酮和 64 $\mu\text{mol/L}$ 桑色素引起的 DMR 信号的量效关系曲线

图5 天然黄酮类 GPR35 激动剂的结构

活性的构效关系(structure-activity relationship, SAR): 黄酮醇类的激动活性强于二氢黄酮类; 这些天然黄酮化合物中 7 位都有羟基取代, 因此推测 7 位羟基取

代对其 GPR35 激动活性至关重要; 在槲皮素结构的基础上 2'位(桑色素)或 8 位(草质素)增加一个羟基之后 GPR35 激动活性增强, 因此说明 2'或 8 位羟基取

代会增加其 GPR35 激动活性。

3 结论

利用无标记细胞整合药理学技术从 38 个黄酮类化合物中发现 7 个 GPR35 受体激动剂, 分别为草质素、异补骨脂二氢黄酮、桑色素、杨梅素、黄芩素、槲皮素和木犀草素, 其中草质素和异补骨脂二氢

黄酮为首次发现的具有 GPR35 受体激动活性的天然黄酮类化合物, EC_{50} 分别为 (1.452 ± 0.093) 和 $(74.727 \pm 6.150) \mu\text{mol/L}$, 而草质素则表现出更强的 GPR35 受体激动活性, 因此有望成为一个具有药物开发潜力的 GPR35 受体激动剂。同时这两个 GPR35 受体激动剂的发现对丰富 GPR35 配体家族成员, 对 GPR35 受体的生物学及药理学的进一步研究也具有重要意义。

参考文献

- 1 Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*, 2007, 70: 461–477
- 2 黄华艺, 查锡良. 黄酮类化合物抗肿瘤作用研究进展. *中国新药与临床杂志*, 2002, 21: 428–433
- 3 延玺, 刘会青, 邹永青, 等. 黄酮类化合物生理活性及合成研究进展. *有机化学*, 2008, 28: 1534–1544
- 4 曹伟国, 刘志勤, 邵云, 等. 黄酮类化合物药理作用的研究进展. *西北植物学报*, 2003, 23: 2241–2247
- 5 O'Dowd B F, Nguyen T, Marchese A, et al. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics*, 1998, 47: 310–313
- 6 Taniguchi Y, Tonai-Kachi H, Shinjo K. Zaprinast, a well-known cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase inhibitor, is an agonist for GPR35. *FEBS Lett*, 2006, 580: 5003–5008
- 7 Wang J H, Simonavicius N, Wu X S, et al. Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. *J Biol Chem*, 2006, 281: 22021–22028
- 8 Zhao P W, Sharir H, Kapur A, et al. Targeting of the orphan receptor GPR35 by pamoic acid: a potent activator of extracellular signal-regulated kinase and beta-arrestin2 with antinociceptive activity. *Mol Pharmacol*, 2010, 78: 560–568
- 9 Ohshiro H, Tonai-Kachi H, Ichikawa K. GPR35 is a functional receptor in rat dorsal root ganglion neurons. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 365: 344–348
- 10 Min K D, Asakura M, Liao Y L, et al. Identification of genes related to heart failure using global gene expression profiling of human failing myocardium. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 393: 55–60
- 11 Sun Y V, Bielak L E, Peyser P A, et al. Application of machine learning algorithms to predict coronary artery calcification with a sibship-based design. *Genet Epidemiol*, 2008, 32: 350–360
- 12 Imielinski M, Baldassano R N, Griffiths A, et al. Common variants at five new loci associated with early-onset inflammatory bowel disease. *Nat Genet*, 2009, 41: 1335–1340
- 13 Sparfel L, Pinel-Marie M L, Boize M, et al. Transcriptional signature of human macrophages exposed to the environmental contaminant benzo(a)pyrene. *Toxicol Sci*, 2010, 114: 247–259
- 14 Barth M C, Ahluwalia N, Anderson T J, et al. Kynurenic acid triggers firm arrest of leukocytes to vascular endothelium under flow conditions. *J Biol Chem*, 2009, 284: 19189–19195
- 15 Yang Y H, Lu J Y, Wu X S, et al. G-protein-coupled receptor 35 is a target of the asthma drugs cromolyn disodium and nedocromil sodium. *Pharmacology*, 2010, 86: 1–5
- 16 Deng H Y, Fang Y. Anti-inflammatory gallic acid and wedelolactone are G protein-coupled receptor-35 agonists. *Pharmacology*, 2012, 89: 211–219
- 17 Oka S, Ota R, Shima M, et al. GPR35 is a novel lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 395: 232–237
- 18 Yang Y H, Fu A, Wu X S, et al. GPR35 is a target of the loop diuretic drugs bumetanide and furosemide. *Pharmacology*, 2012, 89: 13–17
- 19 Deng H Y, Hu H B, He M Q, et al. Discovery of 2-(4-Methylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile and thieno[3,2-b]thiophene-2-carboxylic acid derivatives as G protein-coupled receptor 35 (GPR35) agonists. *J Med Chem*, 2011, 54: 7385–7396
- 20 Deng H Y, Hu H B, Fang Y. Tyrphostin analogs are GPR35 agonists. *FEBS Lett*, 2011, 585: 1957–1962
- 21 Deng H Y, Hu J Y, Hu H B, et al. Thieno[3,2-b]thiophene-2-carboxylic acid derivatives as GPR35 agonists. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22: 4148–4152
- 22 Deng H Y, Hu H B, Ling S Z, et al. Discovery of natural phenols as G protein-coupled receptor-35 (GPR35) agonists. *ACS Med Chem Lett*, 2012, 3: 165–169
- 23 Jenkins L, Brea J, Smith N J, et al. Identification of novel species-selective agonists of the G-protein-coupled receptor GPR35 that promote recruitment of beta-arrestin-2 and activate G(α 13). *Biochem J*, 2010, 432: 451–459

- 24 Taniguchi Y, Tonai-Kachi H, Shinjo K. 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid is a GPR35 agonist. *Pharmacology*, 2008, 82: 245–249
- 25 Deng H Y, Fang Y. Synthesis and agonistic activity at the GPR35 of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid analogues. *ACS Med Chem Lett*, 2012, 3: 550–554
- 26 Hu H B, Deng H Y, Fang Y. Label-free phenotypic profiling identified D-luciferin as a GPR35 agonist. *PLoS One*, 2012, 7: e34934
- 27 Deng H, Fang Y. Aspirin metabolites are GPR35 agonists. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2012, 385: 729–737
- 28 Deng H, Hu H, Fang Y. Multiple tyrosine metabolites are GPR35 agonists. *Sci Rep*, 2012, 2: 373
- 29 Mackenzie A E, Lappin J E, Taylor D L, et al. GPR35 as a novel therapeutic target. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2011, 2: 68
- 30 Fang Y, Ferrie A M, Fontaine N H, et al. Resonant waveguide grating biosensor for living cell sensing. *Biophys J*, 2006, 91: 1925–1940
- 31 Kenakin T P. Cellular assays as portals to seven-transmembrane receptor-based drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8: 617–626
- 32 Fang Y. The development of label-free cellular assays for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*, 2011, 6: 1285–1298
- 33 Fang Y. Label-free cell phenotypic drug discovery. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2014, 17: 566–578
- 34 Hefti J. Drug discovery-tutorial: pheno dynamic protein characterization-a structural, label-free approach for real-time detection of molecular interactions. *Genet Eng News*, 2000, 20: 38–38
- 35 Fang Y. Label-free cell-based assays with optical biosensors in drug discovery. *Assay Drug Dev Technol*, 2006, 4: 583–595
- 36 Fang Y. Guest editor's introduction: label-free optical biosensors to cell biology and drug discovery. *J Recept Signal Transduct Res*, 2009, 29: 127–127
- 37 McGuinness R. Label-free cell-based assays bring greater biorelevance to early drug discovery. *Assay Drug Dev Technol*, 2009, 7: 191–193
- 38 Halai R, Cooper M A. Using label-free screening technology to improve efficiency in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*, 2012, 7: 123–131
- 39 Fang Y. Troubleshooting and deconvoluting label-free cell phenotypic assays in drug discovery. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2013, 67: 69–81
- 40 Deng H Y, Fang Y. Discovery of nitrophenols as GPR35 agonists. *Med Chem Comm*, 2012, 3: 1270–1274
- 41 Jenkins L, Harries N, Lappin J E, et al. Antagonists of GPR35 display high species ortholog selectivity and varying modes of action. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 343: 683–695

Discovery of Two flavonoids as Agonists of G Protein-Coupled Receptor-35

HOU Tao¹, SHI LiYing¹, HE Jian², WANG Ping², WANG JiXia², WEI Lai²,
ZHANG XiuLi² & LIANG XinMiao²

1 School of Life Sciences and Technology, Dalian University, Dalian 116622, China;

2 Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116021, China

GPR35 is an orphan G protein-coupled receptor that is not well-characterized. Identification of new GPR35 ligands is very important for further investigations of GPR35 biology and pharmacology. To identify potential natural products as GPR35 agonists, we screened a series of flavonoids using label-free optical biosensor cellular assay. Of these, herbacetin and isobavachin were found to be the two most potent GPR35 agonists. Of the two agonists, herbacetin, a more promising candidate drug, exhibited a better potency with an EC_{50} of $(1.452 \pm 0.093) \mu\text{mol/L}$.

label-free cellular assays, GPR35, integrative pharmacology, flavonoids, agonist

doi: 10.1360/N052015-00032