

生物检定

基于 HEMT 生物传感的抗组胺药物与 MIF 相互作用及验证研究*

王静¹, 吴志生^{1,2}, 赵小军¹, 赵静¹, 郇星月¹, 郭新雨¹,王恺怡¹, 何晗¹, 姚景春³, 关永霞³, 李市荣³, 张贵民^{3**}, 王逸飞^{4**}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 中药制药与新药开发教育部工程研究中心, 北京 102488;

3. 经方与现代中药融合创新全国重点实验室, 临沂 276005; 4. 北京中医药大学房山医院, 北京 102499)

摘要 目的: 建立生物传感技术集成模式斑马鱼研究方法, 实现盐酸西替利嗪、盐酸非索非那定、咪唑斯汀、依巴斯汀 4 种抗组胺药物与过敏性鼻炎关键靶点巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)相互作用及验证研究。方法: 以砷化镓(AlGaAs/GaAs)高电子迁移率晶体管(HEMT)半导体材料为传感元件, MIF 为生物元件, 构建 MIF-HEMT 生物传感器, 开展盐酸西替利嗪、盐酸非索非那定、咪唑斯汀、依巴斯汀与 MIF 相互作用的强度表征。进一步建立斑马鱼免疫炎症模型, 记录空白组、模型组、阳性药组和低、中、高剂量药物组中性粒细胞迁移数目, 计算药物炎症抑制率。结果: 盐酸西替利嗪与 MIF 的结合能力最强, 解离常数 K_D 值达 $7.05 \times 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 盐酸非索非那定、咪唑斯汀、依巴斯汀与 MIF 作用的解离常数 K_D 值分别为 2.34×10^{-8} 、 1.94×10^{-7} 和 $2.44 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 均与 MIF 有结合作用。进一步采用斑马鱼免疫炎症模型进行验证, 发现 4 种抗组胺药均能显著减少中性粒细胞迁移数量, 其中 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸西替利嗪对中性粒细胞迁移抑制率达到 68.5%。结论: 本研究通过生物传感技术集成模式斑马鱼实验, 实现了抗组胺药物与过敏性鼻炎关键靶点 MIF 相互作用研究, 进一步验证了 MIF 是抗组胺药物发挥药效的潜在靶点, 为药物疗效与作用靶点关联研究提供了重要参考。

关键词: HEMT 生物传感器; 巨噬细胞迁移抑制因子; 过敏性鼻炎; 盐酸西替利嗪; 斑马鱼

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)08-1348-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2023-0817

Study on the interaction and validation of antihistamine drugs with MIF based on HEMT biosensing*

WANG Jing¹, WU Zhi-sheng^{1,2}, ZHAO Xiao-jun¹, ZHAO Jing¹,
 HUAN Xing-yue¹, GUO Xin-yu¹, WANG Kai-yi¹, HE Han¹, YAO Jing-chun³,
 GUAN Yong-xia³, LI Shi-rong³, ZHANG Gui-min^{3**}, WANG Yi-fei^{4**}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2. Engineering Research Center of Chinese Medicine Production and New Drug Development, Ministry of Education of People's Republic of China, Beijing 102488, China; 3. State Key Laboratory of Integration and Innovation of Classic Formula and Modern Chinese Medicine, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276005, China; 4. Fangshan Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102499, China)

Abstract Objective: To establish an integrated model of biosensing technology for the study of zebrafish, and to

* 国家重点研发计划课题(2023YFC3504505); 国家自然科学基金项目(82274110); 国家医学攻关产教融合创新平台-中药智能制造工程平台项目(90010062820031); 北京科技新星交叉项目(20230484458); 中央高校基本科研业务费北京中医药大学揭榜挂帅项目(2022-JYB-JBZR-019, 2022-JYB-JBZR-018); 北京中医药大学横向课题(BCUM-2021-JS-FW-173)

** 通信作者 王逸飞 Tel: 15210691043; E-mail: wenifread@163.com
 张贵民 Tel: (0539)8336001; E-mail: lunanzhangguimin@126.com

第一作者 Tel: 13331313390; E-mail: yongander@163.com

study and verify the interaction between cetirizine hydrochloride, fexofenadine hydrochloride, mizolastine, and ebastine, with the key target of allergic rhinitis, macrophage migration inhibitory factor (MIF). **Methods:** A MIF – high electron mobility transistor (HEMT) biosensor was constructed using AlGaAs/GaAs HEMT as the sensing element and MIF as the biological element. The interaction strength between cetirizine hydrochloride, fexofenadine hydrochloride, mizolastine, and ebastine and MIF was characterized. Furthermore, a zebrafish immune inflammation model was established. The number of neutrophil migration in the blank control group, model group, positive drug group, and low, medium, and high – dose drug groups were recorded. And the drug inflammation inhibition rate were calculated. **Results:** Cetirizine hydrochloride exhibited the strongest binding ability to MIF, with a dissociation constant of $7.05 \times 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The K_D for the interactions between fexofenadine hydrochloride, mizolastine, and ebastine with MIF were $2.34 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $1.94 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $2.44 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. All of them had binding effects with MIF. Further the validation using the zebrafish immune anti – inflammatory model revealed that all four antihistamines significantly reduced the number of neutrophil migrations, among which $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of cetirizine hydrochloride achieved a neutrophil migration inhibition rate of 68.5%. **Conclusion:** This study explores the interaction between antihistamines and the key protein target of AR through the integration of biosensing technology and zebrafish experiments. It was found that MIF is a potential target for antihistamine drugs to exert their pharmacological effects. It provides an important reference for research on drug efficacy and its association with targets.

Keywords: HEMT biosensor; macrophage migration inhibitory factor; allergic rhinitis; cetirizine hydrochloride; zebrafish

过敏性鼻炎 (allergic rhinitis) 是免疫系统接触过敏原由免疫球蛋白 E (IgE) 介导的炎症反应^[1], 引起鼻塞、打喷嚏、流鼻涕等症状, 是全球常见的慢性过敏性疾病之一。自 20 世纪 60 年代以来, 全球过敏性鼻炎的患病率不断增加^[2], 其中成人患病率约为 40%^[3]。目前, 治疗过敏性鼻炎的药物主要是 H₁ 抗组胺药和鼻内皮质类固醇 (INCS) 2 类^[4], 而药物与关键靶点的相互作用研究是当前过敏性鼻炎药物开发亟待攻克的重点难题。

课题组前期从临床真实数据出发, 开发了 1 种新型高电子迁移率晶体管 (high electron mobility transistor, HEMT) 生物传感器, 发现巨噬细胞迁移抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF) 是过敏性鼻炎的关键靶点^[5-6]。MIF 是 T 淋巴细胞衍生的蛋白质, 在巨噬细胞、T 淋巴细胞和嗜酸性粒细胞等中均有表达^[7], 参与过敏和自身免疫性疾病的发生。基于 HEMT 的工作原理是采用如抗体、酶、蛋白质等生物元素修饰于 HEMT 器件上, 随着样品浓度增加, 异质结中二维电子气 (2DEG) 浓度改变, 导致 HEMT 源极和漏极之间电流发生变化^[8], 其高灵敏度、强专属性、低检测限为药物与靶点关联研究提供了关键技术支撑。

盐酸西替利嗪、盐酸非索非那定、咪唑斯汀、依巴斯汀均为抗组胺药, 被国内外多种指南推荐为过敏性鼻炎一线治疗用药^[9]。本研究将自主构建的 MIF – HEMT 生物传感器应用于盐酸西替利嗪、盐酸非索非那定、咪唑斯汀、依巴斯汀与过敏性鼻炎潜在靶点 MIF 相互作用研究中, 进一步构建斑马鱼免疫炎症模型, 实现 4 种抗组胺药物抗炎作用研究, 为治疗过敏性疾病药物与作用靶点关联研究提供重要参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

CHI – 660E 电化学工作站 (上海辰华仪器有限公司), TG16MW 台式高速离心机 (湖南赫西仪器有限公司), KQ – 500DE 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), CV200 真空浓缩仪 (北京吉艾姆科技有限公司), SQR 电子分析天平 (十万分之一, 北京赛多利斯科学仪器有限公司), WMF – 3690 荧光显微镜 (上海无陌光学仪器有限公司), 恒温培养箱 (北京润恒奥仪器)。

1.2 试剂

MIF 蛋白 (批号 10246 – H08H, 规格 100 μg , 纯

度 $\geq 96.0\%$, 储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱)、3-巯基丙酸(批号BCBX028, 质量分数 $\geq 99.0\%$)、碳酰二亚胺盐酸盐(批号5006M12X, 质量分数 $\geq 98.0\%$)、*N*-羟基丁二酰亚胺(批号WXBD1766V, 质量分数 $\geq 97.0\%$)、氯化钠(批号424290251, 质量分数 $\geq 99.0\%$)、氯化钾(批号80636be, 质量分数 $\geq 99.9\%$)、氯化钙(批号10043-52-4, 质量分数 $\geq 99.9\%$)、硫酸镁(批号10034-99-8, 质量分数 $\geq 99.9\%$)、硫酸铜(批号BD122482, 质量分数 $\geq 99.9\%$)、二甲基亚砜(DMSO, 批号d54260)、碳酸氢钠(批号10052-44-2, 质量分数 $\geq 99.8\%$)购于北京中农博信科技有限公司, $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液(PBS, 批号p397575, pH 7.5)购于北京伊诺凯科技有限公司, 三卡因(批号C14493890, 纯度 99.0%)、地塞米松(批号KYHCA63, 纯度 $\geq 98.0\%$)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 盐酸西替利嗪原料(批号28181204, 纯度 $\geq 98.0\%$)由鲁南制药集团股份有限公司提供, 盐酸非索非那定片(批号190529, 规格30 mg)、依巴斯汀片(批号190904, 规格10 mg)、咪唑斯汀片(批号DT013, 规格10 mg)购于京东大药房, 成熟AB野生型斑马鱼和绿色荧光标记中性粒细胞的转基因斑马鱼品系Tg(zlyz:EGFP)由南京一树梨花生物科技有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液 将盐酸非索非那定片、咪唑斯汀片和依巴斯汀片分别去除薄膜衣片, 研至粉末状, 溶于10 mL甲醇, 超声(220 V, 50 Hz)并离心($6\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min, 室温)后取上清液置于真空浓缩仪浓缩, 即得药物活性成分。用 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS将盐酸西替利嗪原料药稀释为 $1\times 10^{-13}\sim 1\times 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的梯度浓度溶液, 其他3种药物活性成分稀释为 $1\times 10^{-13}\sim 1\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的梯度浓度溶液, 过 $0.45\ \mu\text{L}$ 的微孔滤膜, 即得。

2.1.2 MIF蛋白溶液 取MIF蛋白 $100\ \mu\text{g}$, 置于离心管中, 加入 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 1 mL, 配制成 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的MIF蛋白溶液, 取 $30\ \mu\text{L}$ 分装备用。

2.1.3 斑马鱼胚胎培养液 $5.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠、 $0.17\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钾、 $0.4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钙和 $0.16\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸镁溶解于1 L去离子水, 得到斑马鱼胚胎培养液, 用碳酸氢钠溶液调节pH为7.2。

2.2 MIF-HEMT生物传感器的构建与性能考察

采用AlGaAs/GaAs HEMT芯片构建生物传感器, 将透明石英玻璃管粘于芯片表面作为样品池; 向样品池中加入 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 3-巯基丙酸溶液 $60\ \mu\text{L}$, 于室温下反应17~24 h, 在HEMT器件表面形成Au-S键, 从而形成自组装单层; 用超纯水洗去HEMT器件表面的3-巯基丙酸溶液, 加入 $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酰二亚胺盐酸盐溶液和 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ *N*-羟基丁二酰亚胺溶液各 $30\ \mu\text{L}$, 于室温下活化反应15 min, 生成稳定的胺类活化产物, 用于促进羧基活化; 用 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS清洗HEMT芯片后, 加入MIF蛋白溶液 $10\ \mu\text{L}$, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应2 h, MIF蛋白通过共价键固定与芯片上, MIF-HEMT生物传感器构建成功^[10]。

采用MIF-HEMT生物传感器依次检测 $1\times 10^{-13}\sim 1\times 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸西替利嗪溶液电流强度, 每次检测重复3次, 响应的检测浓度低至 $1\times 10^{-13}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 检测信号灵敏度为 $1\times 10^{-6}\text{ A/V}$, 检测范围 $1\times 10^{-13}\sim 1\times 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 跨越11个数量级, 见图1-A; MIF-HEMT生物传感器在同一条件下检测5批浓度为 $10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸西替利嗪溶液的电流强度, 每次检测重复3次, 结果如图1-B所示, RSD为 -0.55% , 表明所构建MIF-HEMT生物传感器的重复性良好; 以 $1\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸西替利嗪溶液为测试样品, MIF-HEMT生物传感器连续5 d在同一条件下检测电流强度, 每次检测重复3次, RSD为 -0.98% , 表明所构建MIF-HEMT生物传感器的稳定性良好。

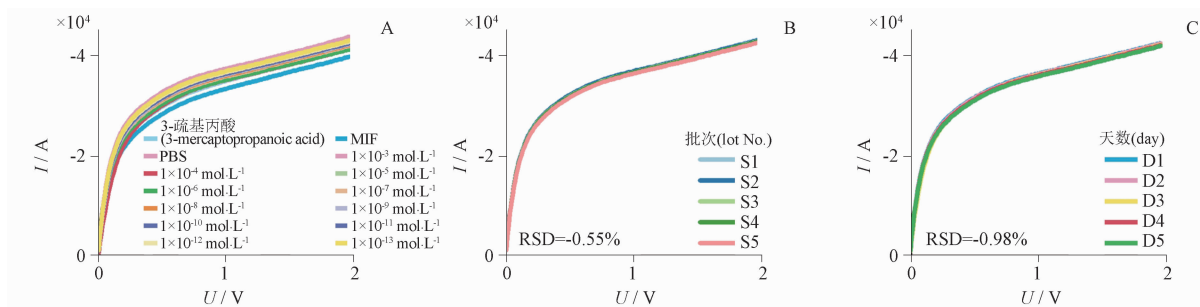
2.3 基于MIF-HEMT生物传感器的抗组胺药物作用于过敏性鼻炎关键靶点MIF的研究

以 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS为空白溶液, 加入制备的MIF-HEMT生物传感器中, 采用电化学平台记录 $0\sim 2\text{ V}$ 电压下的电流强度(I_{DS}); 按浓度由低到高($10^{-13}\sim 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)依次分别向MIF-HEMT生物传感器上样盐酸西替利嗪、盐酸非索非那定、咪唑斯汀、依巴斯汀的供试品溶液, 采用CHI-660E电化学工作站记录电流强度(I_{DS}), 每次检测重复3次, 并根据公式(1)~(3)进行分析^[11]。

$$[A_b] + [A_g] \rightleftharpoons [A_b - A_g] \quad (1)$$

$$K_A = \frac{1}{K_D} = \frac{[A_b - A_g]}{[A_b] + [A_g]} \quad (2)$$

$$\frac{[A_g]}{\Delta I} = \frac{[A_g]}{\Delta I_{\text{max}}} + \frac{K_D}{\Delta I_{\text{max}}} \quad (3)$$



A. 检测范围 (detection range) B. 重复性 (reproducibility) C. 稳定性 (stability)

图1 MIF-HEMT 生物传感器性能考察

Fig. 1 The performance of MIF-HEMT biosensor

其中, $[A_b]$ 为 MIF 的浓度, $[A_g]$ 为盐酸西替利嗪、盐酸非索非那定、咪唑斯汀、依巴斯汀溶液的浓度, K_A 为结合常数, K_D 为解离常数, ΔI 为电流变化值, ΔI_{\max} 为电流最大变化值。

$1 \times 10^{-13} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸西替利嗪与 MIF-HEMT 生物传感器作用的 $I_{\text{DS}} - U_{\text{DS}}$ 信号变化情况如图 2-A1 所示, 加入空白溶液 PBS 后对电流变化影响较小, 表明 PBS 对检测结果影响较小, 且在溶液最小浓度 $1 \times 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 下即有电流变化响应, 随着盐酸西替利嗪浓度的增加, 电流呈现较规律递减。以盐酸西替利嗪浓度的对数为横坐标, 电流变化率为纵坐标进行线性拟合, 结果如图 2-B1 所示, 在 $1 \times 10^{-13} \sim 1 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 有较好线性关系, 拟合方程为 $Y = -6.91 \times 10^{-3} X - 0.107$, $r = 0.9970$ 。以 $1 \times 10^{-13} \sim 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为检测浓度范围, 以盐酸西替利嗪浓度为横坐标, 以浓度与电流变化的比值为纵坐标, 进行线性拟合, 结果如图 2-C1 所示, 拟合方程为 $Y = 8.63 \times 10^4 X + 6.88 \times 10^{-5}$, $r = 0.9995$, 由公式 (1) ~ (3) 计算盐酸西替利嗪与 MIF 相互作用的解离常数 K_D , 可得解离常数 K_D 值为 $7.05 \times 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 表明盐酸西替利嗪与 MIF 有强结合作用, MIF 是盐酸西替利嗪治疗过敏性鼻炎的潜在靶点。

同理, $1 \times 10^{-13} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸非索非那定、咪唑斯汀和依巴斯汀与 MIF-HEMT 生物传感器作用 $I_{\text{DS}} - U_{\text{DS}}$ 信号变化及线性拟合情况如图 2-A2 ~ C4 所示, 具体浓度范围及拟合方程如表 1 所示。盐酸非索非那定、咪唑斯汀和依巴斯汀与 MIF 相互作用的解离常数 K_D 值分别为 2.34×10^{-8} 、 1.94×10^{-7} 和 $2.44 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 表明均与 MIF 有较强结合作用, 进一步验证了 MIF 是治疗过敏性

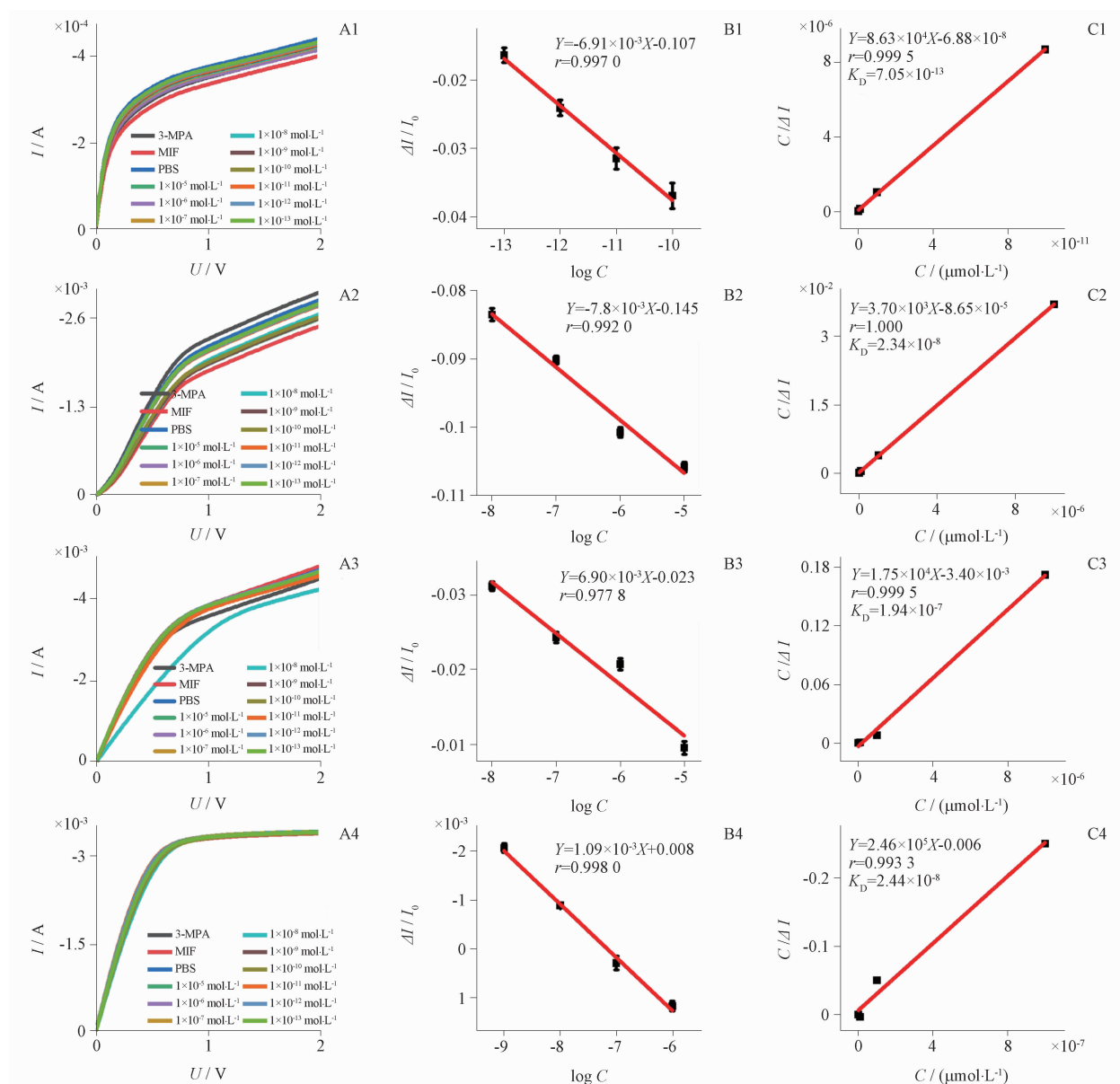
鼻炎的潜在靶点。

2.4 4 种抗组胺药物免疫抗炎药效评价研究

斑马鱼的饲养条件依据经济合作与发展组织 (OECD) 手册, 雌雄斑马鱼分开喂养, 光照 14 h、黑暗 10 h 交替循环, 培养室的温度控制在 $(28 \pm 0.5) \text{ }^\circ\text{C}$, 定时喂以人工颗粒状饵料和刚孵出的卤虫无节幼体。在实验前, 将成年斑马鱼放入雌雄比例为 1:1 的交配池中过夜, 次日将胚胎收集到斑马鱼胚胎培养液中, 并放入 $28.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中进行后续实验。

随机选取受精后 3 d 的成熟 AB 野生型斑马鱼, 按每孔 10 尾置于 12 孔板中, 分别加入 25、50、100、200、500 和 $1000 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸西替利嗪溶液、盐酸非索非那定溶液、咪唑斯汀溶液、依巴斯汀溶液各 3 mL, 并平行 3 个孔。将斑马鱼置于 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下避光孵育, 分别于 24、48、72 h 观察和记录斑马鱼的畸形和死亡情况, 并计算各药物浓度在不同给药时间下的半抑制浓度 (IC_{50})。结果如图 3 所示, 随着药物浓度的增加, 斑马鱼的死亡率显著增加, 计算盐酸西替利嗪的 IC_{50} 为 $182 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 即当药物浓度为 $182 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其对斑马鱼产生 50% 的致死效应; 此外, 计算盐酸非索非那定、咪唑斯汀、依巴斯汀的 IC_{50} 分别为 193、208、222 $\text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。为评价 4 种抗组胺药的抗炎药效, 后续将 4 种抗组胺药的高、中、低浓度分别设置为 100、50、25 $\text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 以确保药物剂量对斑马鱼抑制作用的影响。

选取健康的受精后 3 d 的绿色荧光标记中性粒细胞的转基因斑马鱼, 随机吸入 12 孔板, 每孔 10 枚胚胎, 设置空白组、模型组、阳性药组和低、中、高剂量药物组。阳性药组给予 $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松溶液 3 mL, 低、中、高剂量药物组分别给予 25、50 和 $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸西替利嗪、盐酸非索非那定、咪唑



1. 盐酸西替利嗪 (cetirizine hydrochloride) 2. 盐酸非索非那定 (fexofenadine hydrochloride) 3. 咪唑斯汀 (mizolastine) 4. 依巴斯汀 (ebastine)

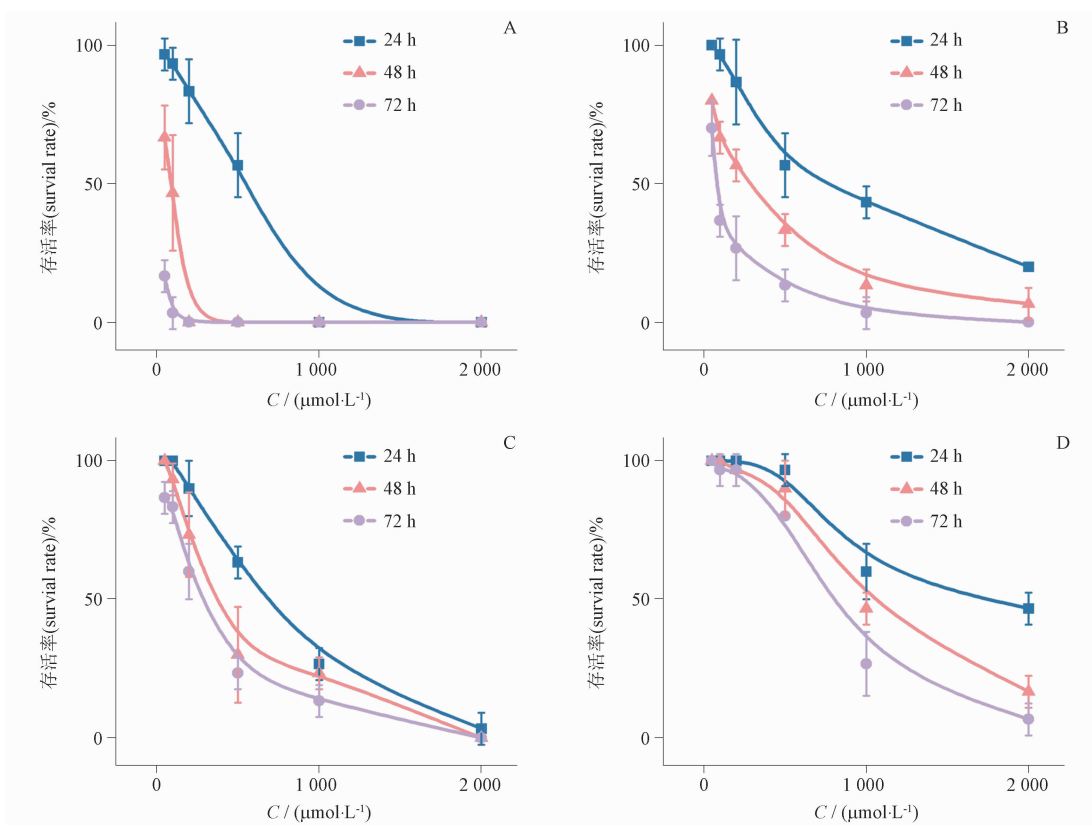
图 2 药物与 MIF 相互作用的 $I_{DS} - U_{DS}$ 信号变化结果 (A)、线性范围及电流变化率 ($\Delta I/I_0$) 与药物浓度间的线性拟合结果 (B、C)

Fig. 2 The $I_{DS} - U_{DS}$ signal changes results (A), linear range, and linear fitting results (B, C) between the current change rate and drug concentration of the interaction of drugs and MIF

表 1 4 种药物与 MIF - HEMT 生物传感器作用

Tab. 1 Interaction of four drugs with the MIF - HEMT biosensor

药物 (drug)	浓度 (concentration) / (mol · L ⁻¹)	拟合方程 (fitted equation)	r	K _D / (mol · L ⁻¹)
盐酸西替利嗪 (cetirizine hydrochloride)	1 × 10 ⁻¹³ ~ 1 × 10 ⁻¹⁰	Y = 8.63 × 10 ⁴ X + 6.88 × 10 ⁻⁵	0.999 5	7.05 × 10 ⁻¹³
盐酸非索非那定 (fexofenadine hydrochloride)	1 × 10 ⁻⁸ ~ 1 × 10 ⁻⁵	Y = 3.70 × 10 ³ X + 8.65 × 10 ⁻⁵	1.000	2.34 × 10 ⁻⁸
咪唑斯汀 (mizolastine)	1 × 10 ⁻⁸ ~ 1 × 10 ⁻⁵	Y = 1.75 × 10 ⁴ X - 3.40 × 10 ⁻³	0.999 6	1.94 × 10 ⁻⁷
依巴斯汀 (ebastine)	1 × 10 ⁻⁹ ~ 1 × 10 ⁻⁶	Y = -2.46 × 10 ⁵ X - 6.00 × 10 ⁻³	0.993 3	2.44 × 10 ⁻⁸



A. 盐酸西替利嗪 (cetirizine hydrochloride) B. 盐酸非索非那定 (fexofenadine hydrochloride) C. 咪唑斯汀 (mizolastine) D. 依巴斯汀 (ebastine)

图3 斑马鱼存活率

Fig. 3 Survival rate of zebrafish

斯汀、依巴斯汀的供试品溶液各 3 mL,空白组和模型组给予斑马鱼培养液。给药 24 h 后,模型组、阳性药物组、低、中、高剂量药物组加入 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸铜溶液处理 2 h。最后,将每组斑马鱼用 0.22% 三卡因麻醉 1 min,置于荧光显微镜下观察中性粒细胞募集行为,采用 Image - J 软件进行记录,并按如下公式计算药物组炎症抑制率 (E)。

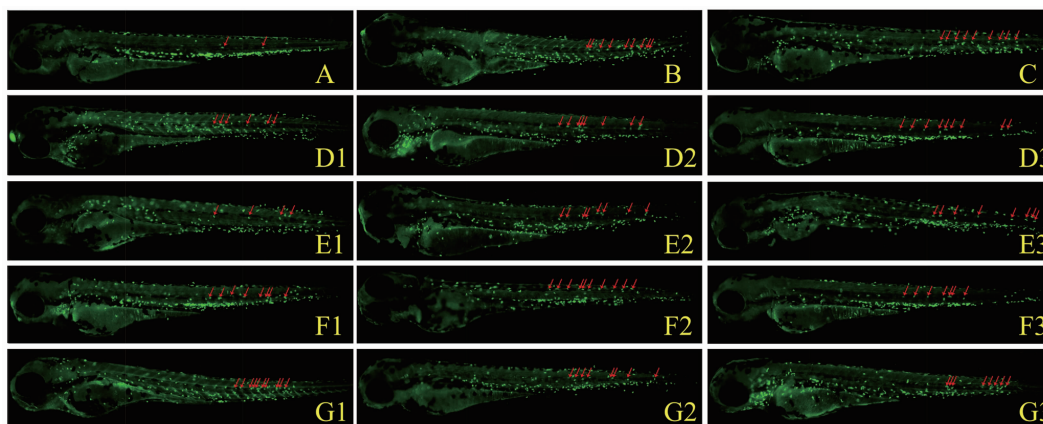
$$E = (N_{\text{模型组}} - N_{\text{药物组}}) / (N_{\text{模型组}} - N_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

各组斑马鱼中性粒细胞迁移情况如图 4 所示。对比空白组,模型组中性粒细胞迁移数量显著增加 ($P < 0.01$),表明损伤与氧化应激加剧,炎症模型成功建立。阳性药物组采用 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松给药,与模型组对比,阳性药物中性粒细胞迁移数量减少 ($P < 0.001$),有显著的炎症消退作用,结果如图 5 所示。如表 2 所示,盐酸西替利嗪、盐酸非索非那定、咪唑斯汀和依巴斯汀低、中、高剂量组相比于模型组中性粒细胞迁移数量均显著减少 ($P < 0.001$),其中又以盐酸西替利嗪迁移数量最少,其低、中、高浓度药物的炎症抑制率分别为 40.3%、52.5%、

68.5%,均强于对应浓度的其他 3 种药物,抗炎效果最强,结果如图 6 所示。

3 讨论

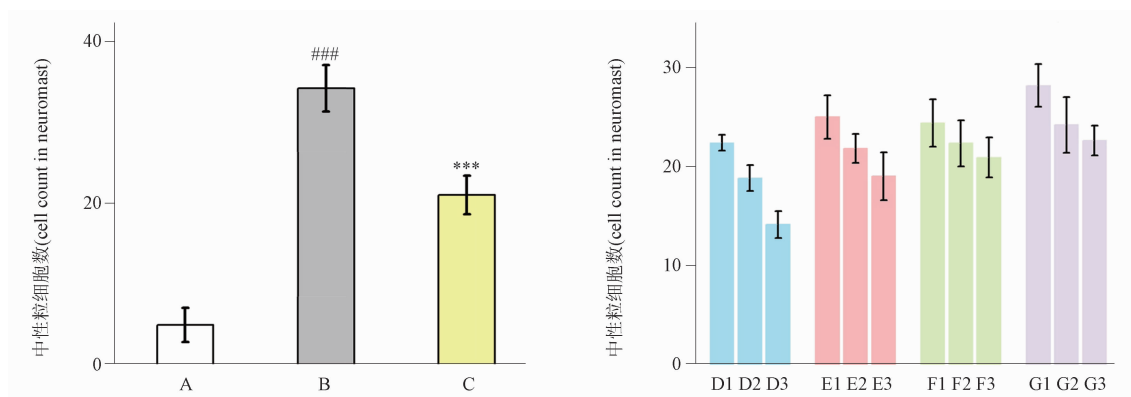
解离常数 K_D 反映了 MIF 与药物小分子的解离速率, K_D 值越小, MIF 与药物的亲和力越强。MIF 是一种稳态趋化因子^[12],在炎症性疾病中发挥关键作用^[13],可调节巨噬细胞反应,并增强促炎细胞因子和其他炎症成分的产生^[14],在过敏性鼻炎的发病机制中发挥重要作用。通过计算 K_D 值发现盐酸西替利嗪、盐酸非索非那定、咪唑斯汀、依巴斯汀均与 MIF 有良好的作用,进一步验证了 MIF 是 4 种抗组胺药物治疗过敏性鼻炎的潜在靶点。其中,盐酸西替利嗪与 MIF 的解离常数 K_D 最小,表明在 4 种抗组胺药物中盐酸西替利嗪作用于 MIF 有更强的治疗过敏性鼻炎的疗效,进而推测 4 种抗组胺药物可能通过直接作用于 MIF,对 MIF 进行调节,降低过敏性鼻炎患者 MIF 的水平,减少 Th2 细胞的分化、分泌和 IgE 的产生,从而减轻过敏性鼻炎的症状。此外,盐酸西替利嗪是作用效果最强的二代抗组胺药,其疗效远



1. 低浓度 (low concentration) 2. 中浓度 (medium concentration) 3. 高浓度 (high concentration)
 C. 地塞米松 (dexamethasone) D. 盐酸西替利嗪 (cetirizine hydrochloride) E. 盐酸非索非那定 (fexofenadine hydrochloride) F. 咪唑斯汀 (mizolastine) G. 依巴斯汀 (ebastine)

图 4 空白组 (A)、模型组 (B) 和药物组 (C~G) 斑马鱼炎症部位中性粒细胞荧光图

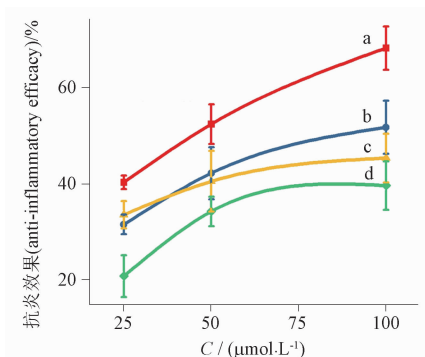
Fig. 4 Fluorescence images of neutrophils in the inflammatory site of zebrafish in the control group (A), model group (B), and drug group (C-G)



A ~ G. 同图 4 (same as Fig. 4)

图 5 中性粒细胞迁移统计图 (###: 与空白组相比, 模型组 $P < 0.001$; ***: 与模型组相比, 阳性药物组 $P < 0.001$)

Fig. 5 Statistical chart of cell count in neuromast (###: compared with the blank group, the model group $P < 0.001$; ***: compared with the model group, the positive drug group $P < 0.001$)



a. 盐酸西替利嗪 (cetirizine hydrochloride) b. 盐酸非索非那定 (fexofenadine hydrochloride) c. 咪唑斯汀 (mizolastine) d. 依巴斯汀 (ebastine)

图 6 药物组抗炎药效图

Fig. 6 Anti-inflammatory efficacy of drug group

高于盐酸非索非那定、咪唑斯汀及依巴斯汀^[9], 并有研究表明盐酸西替利嗪具有与其组胺拮抗作用无关的抗炎活性, 可抑制 MIF 的释放, 进而在过敏性疾病中发挥作用^[15]。

本实验通过自主构建 MIF-HEMT 生物传感器集成斑马鱼免疫抗炎活性试验, 将其应用于盐酸西替利嗪、盐酸非索非那定、咪唑斯汀、依巴斯汀与过敏性鼻炎关键靶点 MIF 相互作用的研究中。通过计算 4 种药物的解离常数 K_D 值, 表明均与 MIF 有较好的结合作用, 揭示了 MIF 作为潜在靶点参与抗组胺药治疗过敏性鼻炎的过程。其中, 又以盐酸西替利嗪与 MIF 的结合能力最强, 达到 $7.05 \times 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 表明

表 2 斑马鱼神经丘细胞数量

Tab. 2 The cell count of neuromast of zebrafish

组别 (group)	侧线神经丘中性粒 细胞迁移数量 ± SD (cell count in neuromast ± SD)	P
空白组 (blank group)	4 ± 2.15	/
模型组 (model group)	34 ± 2.89	<0.001
地塞米松 (dexamethasone)	21 ± 2.40	<0.001
盐酸西替利嗪 (cetirizine hydrochloride)		
25 μmol · L ⁻¹	22 ± 0.82	<0.001
50 μmol · L ⁻¹	18 ± 1.31	<0.001
100 μmol · L ⁻¹	14 ± 1.34	<0.001
盐酸非索非那定 (fexofenadine hydrochloride)		
25 μmol · L ⁻¹	25 ± 2.21	<0.001
50 μmol · L ⁻¹	21 ± 1.47	<0.001
100 μmol · L ⁻¹	19 ± 2.43	<0.001
咪唑斯汀 (mizolastine)		
25 μmol · L ⁻¹	24 ± 2.41	<0.001
50 μmol · L ⁻¹	22 ± 2.34	<0.001
100 μmol · L ⁻¹	20 ± 2.05	<0.001
依巴斯汀 (ebastine)		
25 μmol · L ⁻¹	28 ± 2.16	<0.001
50 μmol · L ⁻¹	24 ± 2.82	<0.001
100 μmol · L ⁻¹	22 ± 1.51	<0.001

其在 4 种药物中用于治疗过敏性鼻炎的效果最强。4 种抗组胺药对斑马鱼抗炎作用研究中,发现了盐酸西替利嗪较其他 3 种抗组胺药具有显著抑制炎症作用,且疗效随剂量增加而提升,与 MIF - HEMT 生物传感器研究结果一致。这表明本研究构建的 MIF - HEMT 生物传感技术集成斑马鱼实验策略可实现药物与作用靶点关联研究,不仅为药物直接影响关键作用靶点提供新的研究视角,也为 HEMT 生物传感器在药物领域的研究应用提供了新的方向。

参考文献

- [1] SHAMJI MH, DURHAM SR. Mechanisms of allergen immunotherapy for inhaled allergens and predictive biomarkers [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 140(6): 1485
- [2] BOUSQUET J, ANTO JM, BACHERT C, *et al.* Allergic rhinitis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6(1): 95
- [3] BROZEK JL, BOUSQUET J, AGACHE I, *et al.* Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines - 2016 revision [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 140(4): 950
- [4] THURMOND RL, GELFAND EW, DUNFORD PJ. The role of histamine H₁ and H₄ receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(1): 41
- [5] MA L, ZHENG Y, WANG J, *et al.* Development of MIF/IL - 1beta biosensors for discovery of critical quality attributes and potential allergic rhinitis targets from clinical real - world data by intelligent algorithm coupled with *in vitro* and *in vivo* mechanism validation [J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 194: 113608
- [6] MA CF, MA LJ, WANG ZJ, *et al.* Original end - to - end smart diagnosis framework of systematic critical quality attributes meets FDA standards of phytomedicine by biosensor and multi - information fusion coupled with AI algorithm [J]. *Green Chem*, 2023, 25(1): 384
- [7] O' REILLY C, DOROUDIAN M, MAWHINNEY L, *et al.* Targeting MIF in cancer: therapeutic strategies, current developments, and future opportunities [J]. *Med Res Rev*, 2016, 36(3): 440
- [8] PAL P, PRATAP Y, GUPTA M, *et al.* Modeling and simulation of AlGaIn/GaN MOS - HEMT for biosensor applications [J]. *IEEE Sensors*, 2019, 19(2): 587
- [9] SANCHEZ - BORGES M, ANSOTEGUI IJ. Second generation antihistamines: an update [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2019, 19(4): 358
- [10] 马朝富, 王子健, 马丽娟, 等. 基于 MIF - HEMT 生物传感技术的同仁牛黄清心丸关键质量属性测量研究 [J]. *药学学报*, 2023, 58(10): 2853
- MA CF, WANG ZJ, MA LJ, *et al.* The measurement of critical quality attributes of Tongren Niu Huang Qingxin pills based on MIF - HEMT biosensor technology [J]. *Acta Pharm Sin*, 2023, 58(10): 2853
- [11] MA LJ, LI BY, MA JC, *et al.* Novel discovery of schisandrin A regulating the interplay of autophagy and apoptosis in oligoasthenospermia by targeting SCF/c - kit and TRPV1 via biosensors [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13(6): 2765
- [12] CHEN J, WANG H, JIA L, *et al.* Bufalin targets the SRC - 3/ MIF pathway in chemoresistant cells to regulate M₂ macrophage polarization in colorectal cancer [J]. *Cancer Lett*, 2021, 513: 63
- [13] OSIPYAN A, CHEN D, DEKKER FJ. Epigenetic regulation in macrophage migration inhibitory factor (MIF) - mediated signaling in cancer and inflammation [J]. *Drug Discov Today*, 2021, 26(7): 1728
- [14] CALANDRA T, ROGER T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(10): 791
- [15] SHIMIZU T, NISHIHARA J, WATANABE H, *et al.* Cetirizine, an H₁ - receptor antagonist, suppresses the expression of macrophage migration inhibitory factor: its potential anti - inflammatory action [J]. *Clin Exp Allergy*, 2004, 34(1): 103

(本文于 2023 年 12 月 23 日收到)