

报告基因法测定人绒毛膜促性腺激素生物活性

黄盈^{1,2#}, 张孝明^{2#}, 李鹤洋², 王绿音², 张慧², 吕萍², 李晶^{2*},
高向东^{1*}, 梁成罡^{2*}

(1. 中国药科大学, 江苏南京 211198; 2. 中国食品药品检定研究院, 国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 北京 102629)

摘要: 本研究根据人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) 与受体结合后激活 cAMP 信号通路, 构建一种 LHCGR-CRE-luc-HEK293 转基因细胞系, 采用荧光素酶检测系统对 hCG 进行生物活性检测, 利用四参数拟合分析计算样品相对效价。并且对该方法条件进行优化, 对方法的专属性、相对准确度、精密度和线性进行验证。结果显示, hCG 浓度与报告基因表达量存在量效关系, 且符合四参数曲线。经优化后, 条件确定为 hCG 初始浓度为 $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 稀释倍数为 1:4, 细胞数为每孔 10 000~15 000 个, 诱导时间为 6 h。该方法具有良好的专属性, 相对准确度的相对偏倚范围在 $-8.9\%\sim 3.4\%$, 线性回归方程相关系数为 0.996, 中间精密度几何变异系数范围为 $3.3\%\sim 15.0\%$, 线性范围为 $50\%\sim 200\%$ 。本研究成功建立并验证了一种报告基因法检测 hCG 生物学活性, 可以用于 hCG 生物活性检测和质量控制。

关键词: 报告基因法; 人绒毛膜促性腺激素; 四参数曲线; 生物活性; 方法学验证

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)02-0432-07

A reporter gene assays for bioactivity determination of human chorionic gonadotropin

HUANG Ying^{1,2#}, ZHANG Xiao-ming^{2#}, LI He-yang², WANG Lü-yin², ZHANG Hui², LÜ Ping²,
LI Jing^{2*}, GAO Xiang-dong^{1*}, LIANG Cheng-gang^{2*}

(1. China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China; 2. National Institutes for Food and Drug Control, NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Beijing 102629, China)

Abstract: This study constructed a LHCGR-CRE-luc-HEK293 transgenic cell line according to the activation of the cAMP signaling pathway after recombinant human chorionic gonadotropin binding to the receptor. The biological activity of recombinant human chorionic gonadotropin was assayed using a luciferase assay system. The relative potency of the samples was calculated using four-parameter model. And the method conditions were optimized to validate the specificity, relative accuracy, precision and linearity of the method. The results showed that there was a quantitative potency relationship of human chorionic gonadotropin (hCG) in the method and it was in accordance with the four-parameter curve. After optimization, the conditions were determined as hCG dilution concentration of $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, dilution ratio of 1:4, cell number of 10 000–15 000 cells/well, and induction time of 6 h. The method had good specificity, relative accuracy with relative bias ranging from -8.9% to 3.4% , linear regression equation correlation coefficient of 0.996, intermediate precision geometric coefficient of variation ranging from 3.3% to 15.0% , and linearity range of 50% to 200% . This study successfully established and validated

收稿日期: 2023-04-28; 修回日期: 2023-09-08.

基金项目: 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金 (2022A1).

#共同第一作者.

*通讯作者 E-mail: li_jing@nifdc.org.cn; xdgao@cpu.edu.cn; liangchenggang@nifdc.org.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0545

a reporter gene method to detect hCG biological activity, which can be used for hCG biological activity assay and quality control.

Key words: reporter gene assay; human chorionic gonadotropin; four-parameter curve; biological activity; method validation

人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) 是一种糖蛋白激素, 在人们的疾病治疗中发挥着关键的作用^[1]。hCG是由胎盘合体滋养层细胞分泌的促性腺激素, 能在早期妊娠的时候, 维持黄体不衰退, 刺激黄体细胞产生黄体酮, 可以用于辅助生殖和治疗不孕不育症^[2]。此外, 它还能用于治疗性机能障碍, 如阳痿、隐睾以及侏儒症等^[3,4]。

随着生物技术研究的深入, 更多的厂家使用重组DNA技术来生产重组人绒毛膜促性腺激素 (recombinant human chorionic gonadotropin, rhCG), 从而能够保证药物的来源稳定充足以及产品的安全性^[5]。目前国内已上市的rhCG产品包括进口国外制造商的rhCG产品艾泽®和国内药企研发生产的rhCG产品丽得宝; 已批准的适应证包括青春期前隐睾症的诊断和治疗、垂体功能低下所致的男性不育、垂体促性腺激素不足所致的女性无排卵性不孕症、用于体外受精以获取多个卵母细胞、女性黄体功能不全、习惯性流产等。由于hCG药物具有复杂的性质和作用机制^[6-8], 现有的生物活性测定方法主要依赖于动物实验, 目前各国药典收录的测定方法有: 小鼠子宫增重法^[9]、大鼠子宫增重法^[10]、大鼠精囊增重法^[11]。其中中国药典(2020版)中收录了hCG的生物测定法为小鼠子宫增重法^[9], 但是动物实验存在着动物个体间差异大、定量难、实验周期长、花费多等问题^[12]。随着分子生物学和基因工程技术的进步, 对hCG作用机制有了更深入的研究, 包括受体的激活、信号通路和最终的效应, 能够利用报告基因法对hCG进行生物学活性测定^[13]。同属于GPHs的促卵泡激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 和促甲状腺激素 (thyroid-stimulating hormone, TSH) 现均已建立的报告基因法生物活性检测方法^[14-16]。本研究通过构建一种转基因细胞, 用hCG作用于该细胞, 通过信号通路调控, 激活响应元件, 使报告基因表达, 产生荧光信号, 采用Steady-Glo Luciferase Assay System检测荧光素酶表达情况来反映hCG的生物学活性。然后根据中国药典通则9401对本方法进行优化与验证^[17], 结果表明, 本方法具有准确度高、专属性好、稳定性好等优点。本文提供了一种更简便、准确定量、高通量的基于细胞的hCG生物活性测定方法, 有望作为体内动物法的补充或者替代用于hCG的生物活性检测和质量控制。

材料与方法

仪器 CellXpert C170i二氧化碳细胞培养箱 (德国Eppendorf公司); TS2-FL倒置显微镜 (日本Nikon公司); SORVall ST8台式离心机 (美国Thermo Scientific公司); TC-20全自动细胞计数仪 (美国Bio-Rad公司); MTS 2/4微孔板振荡器 (德国IKA公司); 多功能酶标仪 (美国PerkinElmer公司, 内置软件版本4.13.3005.1482); LC-20A液相色谱仪 (日本岛津公司)。

供试品与试剂 HEK293细胞购自Procell公司; MEM培养基 (11765054)、胎牛血清 (FBS, 10099141)、0.25%胰酶-EDTA (25200056)、磷酸盐缓冲液 (PBS, 20012027) 均购自Gibco公司; Steady-Glo Luciferase Assay System (E2520) 购自Promega公司; puromycin (P8230) 购自Solarbio公司; zeocin (ZEL-43-05) 购自InvivoGen公司; 重组人绒毛膜促性腺激素 (rhCG) 标准品 (410021-201901)、绒毛膜促性腺激素 (hCG) 标准品 (150513-201910)、重组人促卵泡激素 (recombinant human follicle-stimulating hormone, rhFSH) 标准品 (410018-201701) 均来自中国食品药品检定研究院; 促黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 国际标准品 (81/535)、重组人促甲状腺激素 (recombinant human thyroid-stimulating hormone, rhTSH) 国际标准品 (03/192) 购自英国国家生物制品检定所; pLU-LHCGR和pLU.Luc.CRE.PGK.Puro载体购自苏州东岭生物技术有限公司; 注射用绒毛膜促性腺激素 (批号为230205、230206、230301、230302、230303、230304、230305、230306、230307、230308) 和注射用重组人绒毛膜促性腺激素 (批号为202106001、202204001、202207002) 由企业提供。

试剂配制 完全培养基: MEM培养基 + 10% FBS + 3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Puromycin + 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Zeocin; 样品稀释液/基础培养基: MEM培养基。

细胞系构建 将pLU-LHCGR (luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor) 慢病毒载体转入HEK293细胞, 然后用zeocin对细胞进行筛选。用表达荧光素酶的pLU.Luc.CRE(cAMP response element).PGK.Puro载体转入LHCGR-HEK293细胞, 用puromycin筛选得到LHCGR-CRE-luc-HEK293细胞株。用完全培养基 (MEM培养基 + 10% FBS + 3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ puromycin + 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ zeocin) 筛选转染的细胞, 经过约3周的筛

选,通过有限稀释法得到阳性的单克隆细胞株。将细胞株命名为LHCGR-CRE-luc-HEK293细胞株,由本实验室保存。

数据分析 参照《中华人民共和国药典》2020版四部通则1431“四参数回归计算法”^[18],使用GraphPad8.0软件和SoftMax9.0软件,以浓度取10为底对数值为横坐标,对应的相对光单位(relative light unit, RLU)几何平均值为纵坐标拟合四参数曲线。并对结果进行可靠性测验,满足系统适用性要求,即四参数曲线需在所用的剂量范围内,对数剂量与反应呈S形曲线关系,回归项应非常显著($P < 0.01$),偏离平行和模型失拟均不显著($P \geq 0.05$)。对于通过可靠性测验的实验结果,采用约束模型中S和T拟合曲线 EC_{50} 的比值,计算供试品的相对效价(R)。 $R = (\text{标准品 } EC_{50} / \text{供试品 } EC_{50}) \times 100\%$,供试品效价(P_T)为 $P_T = \text{标示量 } (A_T) \cdot R$ 。

方法学优化

细胞培养时间 取对数生长期的LHCGR-CRE-luc-HEK293细胞用PBS润洗后计数,用基础培养基将细胞浓度稀释至 $2 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$,接种至白色不透光的96孔板中,每孔50 μL ,晃动使细胞分布均匀。将接种了细胞的96孔板放置于 CO_2 培养箱中,条件为 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$,两板的细胞贴壁时间分别为0和18 h。取rhCG标准品一支,加入1 mL PBS溶解样品,得到浓度为 $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品溶液。用样品稀释液稀释得到 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的rhCG样品溶液。取浓度为 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品溶液进行5倍梯度(1:4)稀释,共10个浓度梯度。分别取10个浓度的样品溶液按每孔50 μL 加入接种细胞的96孔板中,平行2个复孔,轻轻晃动混匀。将加入样品的96孔板放置于 CO_2 培养箱中,条件为 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$,孵育6 h。每孔加100 μL 混合均匀的Steady-Glo细胞裂解液,使用振荡机300 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 避光轻摇5 min。使用EnSpire酶标仪读取荧光信号值。

确定量效范围 取对数生长期的LHCGR-CRE-luc-HEK293细胞用PBS润洗后计数,用基础培养基将细胞浓度稀释至 $2 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$,接种至白色不透光的96孔板中,每孔50 μL ,晃动使细胞分布均匀。将接种了细胞的96孔板放置于 CO_2 培养箱中,条件为 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$,孵育12~18 h。将rhCG标准品溶液用样品稀释液稀释至浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,稀释比1:5,稀释20个浓度梯度,每个梯度平行2个复孔。其他条件同细胞培养时间步骤。

稀释倍数 根据上一步确定的量效范围,选取rhCG的最佳初始浓度为 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,调整稀释比,根据反应曲线确定稀释比。设置样品稀释比分别为4倍(1:3)、5倍(1:4)、6倍(1:5),系列稀释10个浓度梯度,

每个梯度做2个复孔,其他条件同细胞培养时间步骤。

细胞密度 根据上一步的结果确定样品溶液的最优初始浓度为 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,稀释比为1:4,探究不同细胞密度的量效曲线。将LHCGR-CRE-luc-HEK293细胞消化离心后,用基础培养基分别稀释成密度为 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 $4 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 四个浓度的细胞悬液,接种至白色不透光96孔板中,每孔50 μL 。其他条件同细胞培养时间步骤。

孵育时间 由前面的结果得到优化后的条件分别为rhCG标准品溶液的初始浓度为 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,稀释比为1:4,细胞密度 $(2 \sim 3) \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。探究不同孵育时间的量效曲线。将LHCGR-CRE-luc-HEK293细胞消化离心后,用基础培养基稀释成 $(2 \sim 3) \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液,分别接种至五个白色不透光96孔板中,每孔50 μL 。将接种了细胞的96孔板放置于 CO_2 培养箱中,条件为 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$,孵育12~18 h。加入样品溶液后分别孵育3、4、5、6、8 h。其他条件同细胞培养时间步骤。

方法学验证

专属性 hCG属于糖蛋白激素家族,糖蛋白激素还包括促黄体生成素、促卵泡激素、促甲状腺激素。因此,本研究选取了hCG、LH、rhTSH、rhFSH进行试验,验证该方法的专属性。将hCG、LH、rhTSH、rhFSH样品溶液用基础培养基均稀释到相同的摩尔浓度 $68.12 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$,再用样品稀释液进行5倍的梯度稀释,共稀释10个浓度梯度,每个浓度2个复孔。加入样品后孵育6 h,以rhCG标准品作为参比品。

相对准确度、线性、中间精密度、重复性和范围 初始浓度为 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的rhCG作为方法验证中准确度的参比品,分别制备参比品浓度的50%、71%、100%、141%、200%作为待验证的样品,参比品和样品都进行5倍的梯度稀释,共稀释10个浓度梯度,每个浓度2个复孔。每个效价水平由2名分析人员在4个不同日期使用4个细胞代次进行相对效价的测定。根据中国药典9401通则以每个效价水平测得的相对效价的几何标准偏差或几何变异系数来评价中间精密度^[17]。

细胞功能稳定性实验 在细胞连续培养中,分别冻存第10代、第20代、第30代、第40代细胞。在同一时间进行复苏,连续传代三次。将上述不同代次的细胞使用优化后的条件进行rhCG的生物活性测定,验证不同代次细胞的稳定性。

破坏性实验 在强光和高温情况下rhCG会发生结构的变化^[12],设置光照强度为100%对rhCG溶液分别照射0、5、10、25、30天,以及分别用高温 60°C 加热样品0、3、6、10、15 h。对被处理后的样品进行相对效

价的测定,研究该方法的灵敏度。使用分子排阻色谱法 (SEC-HPLC) 检测经过高温和强光处理后的 rhCG 样品,用面积归一化法检测样品中单体的纯度。

取 rhCG 标准品,分装到 1.5 mL 离心管中,用封口膜封闭后置于加热板中。设置加热温度为 60 °C,分别加热 0、3、6、10、15 天。取 rhCG 标准品,分装到 1.5 mL 离心管中,用封口膜封闭后置于稳定性试验箱中。设置光照强度为 100%,分别强光照 0、5、15、25、30 天。

采用 Waters XBridge Protein BEH SEC 200A 3.5 μm (7.8 mm × 300 mm) 凝胶色谱柱,以 0.1 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄ (pH 6.0) 为流动相,流速为 0.86 mL·min⁻¹,柱温为 25 °C,检测波长为 214 nm,进样量为 10 μL。

评价体内法和体外法的相关性 为了确定本研究建立的报告基因法与动物体内法 [根据中国药典 (2020 版) 通则 1209 绒促性素生物测定法^[9]] 结果的相关性,选取来自生产企业的 10 批注射用绒促性素和 3 批注射用重组人绒促性素,分别用报告基因法和动物法对样品进行生物学活性的检测。

结果

1 方法优化

1.1 细胞培养时间 根据四参数曲线结果显示,细胞铺板时间为 0 h 时 RLU 值较低;细胞铺板时间为 18 h,细胞贴壁后加药孵育的 RLU 值较高。说明细胞贴壁过夜可达到更好的量效曲线结果,所以确定细胞在加药孵育前贴壁过夜。结果见图 1A。

1.2 量效范围 设置 rhCG 初始浓度为 100 μg·mL⁻¹,稀释比 1:5,稀释 20 个浓度梯度,平行两个复孔。所有的点已经覆盖了四参数曲线的上平台与下平台,结果见图 1B。为了进一步的确定样品的初始浓度,根据剂量反应曲线的上下平台和线性部分,选取 2.5~25 μg·mL⁻¹ 为合适的起始浓度范围,进行下一步实验。当起始浓度为 2.5 μg·mL⁻¹ 时,四参数曲线上各点分布较为均匀,上下平台各三个点,线性部分有四个点, R^2 值为 0.990,实验结果见图 1C。因此选择 2.5 μg·mL⁻¹ 为起始浓度。

1.3 稀释倍数 根据量效范围实验确定了起始浓度为 2.5 μg·mL⁻¹,为了使四参数曲线能够很好的覆盖上下平台,并且在线性部分的点不少于 3 个,根据预实验选取了 1:3、1:4、1:5 三个稀释倍数,各稀释 10 个梯度,比较不同稀释比的曲线,结果见图 1D。三个稀释倍数曲线 R^2 值均在 0.990 以上,当稀释倍数为 1:3 时,下平台浓度点太少;当稀释倍数为 1:5 时,下平台浓度点太多;当稀释倍数为 1:4 时,量效曲线能够很好的覆盖上下平台以及线性部分,因此选取 1:4 为 rhCG 的稀释倍数。

1.4 细胞密度 通过比较信噪比和四参数曲线的变

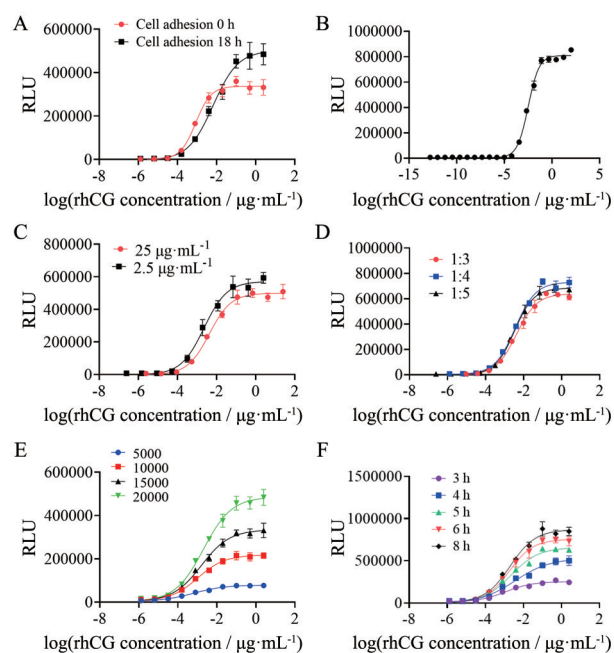


Figure 1 Optimization of cell adhesion time (A), concentration (B and C), dilution times (D), cell numbers (cells per well, E) and incubation time (F). RLU: Relative light unit; rhCG: Recombinant human chorionic gonadotropin

化趋势,当接种细胞量为 10 000、15 000、20 000 个/孔时, B 值分别为 0.623、0.601、0.601,曲线变化趋势基本平行,说明接种细胞的量对实验结果的影响变化趋于稳定,结果见图 1E。当接种细胞量为 20 000 个/孔时信噪比最大,但是复孔间 RSD% 比 10 000 和 15 000 个/孔时大。由于接种细胞的数量不能精确定,所以实验将控制接种细胞密度范围为 10 000~15 000 个/孔。

1.5 孵育时间 设置药物作用的时间分别为 3、4、5、6、8 h,孵育时间为 3 和 4 h 时,未能很好的展现量效曲线。当孵育时间为 5、6、8 h 时, B 值分别为 0.601、0.699、0.657, EC_{50} 值均为 0.002 mol·L⁻¹,四参数曲线变化趋向基本平行,说明药物作用时间对实验结果的影响变化趋于稳定,结果如图 1F 所示。信噪比在孵育 8 h 后最大,但是 6 h 也满足检测要求,考虑到节约时间,选择药物作用时间为 6 h 进行下一步实验。

2 方法学验证

2.1 专属性 用优化后的报告基因法对其他糖蛋白激素 LH、rhFSH、rhTSH 进行生物学活性测定,结果见图 2A, rhTSH 和 rhFSH 均无剂量依赖的效应曲线, LH 的量效曲线无上平台且与 rhCG 曲线有明显差别,而 hCG 和 rhCG 均呈明显的量效曲线,因此该方法专属性良好。

2.2 相对准确度、线性、中间精密度、重复性和范围 根据通则 9401^[17] 计算每个效价水平 8 个相对效价测定值的相对偏倚及其置信区间。如表 1 所示,5 个效价水平相

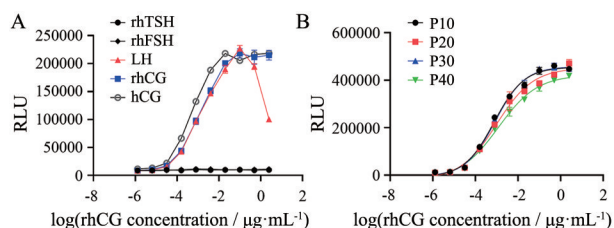


Figure 2 Specificity of reporter gene assay (A). Functional stability of cells (B). rhTSH: Recombinant human thyroid-stimulating hormone; rhFSH: Recombinant human follicle-stimulating hormone; LH: Luteinizing hormone; hCG: Human chorionic gonadotropin

对效价测定值的平均相对偏倚范围在-8.9%~3.4%。以效价理论值的自然对数 (y) 对其相应的效价测定值的自然对数 (x) 作直线回归, 采用最小二乘法进行线性拟合, 回归方程为 $y = 0.944 6x + 0.021 2$, $R^2 = 0.996$ 。

根据通则 9401^[17] 计算每个效价水平测得的 8 个相对效价的几何标准偏差 (GSD%) 及几何变异系数 (GCV%)。以每个效价水平的 GCV% 考察中间精密度的 GCV% 范围为 3.3%~15.0%, 5 个效价水平的 GCV% 均小于 20%。

2.3 细胞功能稳定性实验 结果如图 2B 显示, 不同

代次细胞的 EC₅₀ 值无明显差异 (SD 值为 0.000 2, CV% 为 0.2), 说明 LHCGR-CRE-luc-HEK293 细胞具有稳定性, 可以用于生物活性测定。细胞传代至 40 代时, 对 rhCG 生物活性检测结果没有明显影响。

2.4 破坏性实验 如图 3A、D 所示, 当样品经过 60 °C 加热和光照后样品单体含量发生变化。经过面积归一化法计算可得, 结果如图 3B、E 所示, 被加热和光照破坏的样品中单体含量下降, 聚体和降解产物的含量上升。单体含量下降导致样品生物学活性发生改变, 将上述破坏性样品进行生物学活性检测, 结果如图 3C、F 所示, 经破坏处理的样品生物学活性与单体含量成正比趋势, 本方法可以准确测得各样品的生物学活性。

2.5 报告基因法与体内动物法比较 对本研究建立的报告基因法和使用药典现行的动物法进行相关性评价, 分别用优化后的报告基因方法条件和小鼠子宫增重法对 10 批注射用绒促性素制剂和 3 批注射用重组人绒促性素进行相对生物学活性的检测, 注射用绒促性素制剂使用绒促性素国家标准品作为标准品, 注射用重组人绒促性素使用 rhCG 国家标准品作为标准品。各批次制剂获得结果四参数曲线的 R² 值都达到 0.99 以上。对这两组数据进行 Shapiro-Wilk 检验, 体内法和体外细

Table 1 The relative bias and confidence interval of relative bioactivity of five potency levels. LCL: Lower confidence limit; UCL: Upper confidence limit

Level/%	n	Relative potency/%			Potency/%			Relative bias/%		
		Average	LCL	UCL	Average	LCL	UCL	Average	LCL	UCL
50	8	-0.786 0	-0.869 1	-0.702 9	0.459 4	0.421 6	0.497 2	-8.9	-16.1	-1.0
71	8	-0.367 6	-0.460 8	-0.274 4	0.699 8	0.635 8	0.763 8	-2.5	-11.2	7.0
100	8	0.033 3	0.002 5	0.064 0	1.035 3	1.003 5	1.067 2	3.4	0.3	6.6
141	8	0.311 8	0.262 6	0.361 1	1.370 6	1.302 5	1.438 9	-3.1	-7.8	1.8
200	8	0.697 5	0.675 9	0.719 1	2.010 9	1.968 2	2.053 7	0.4	-1.7	2.6

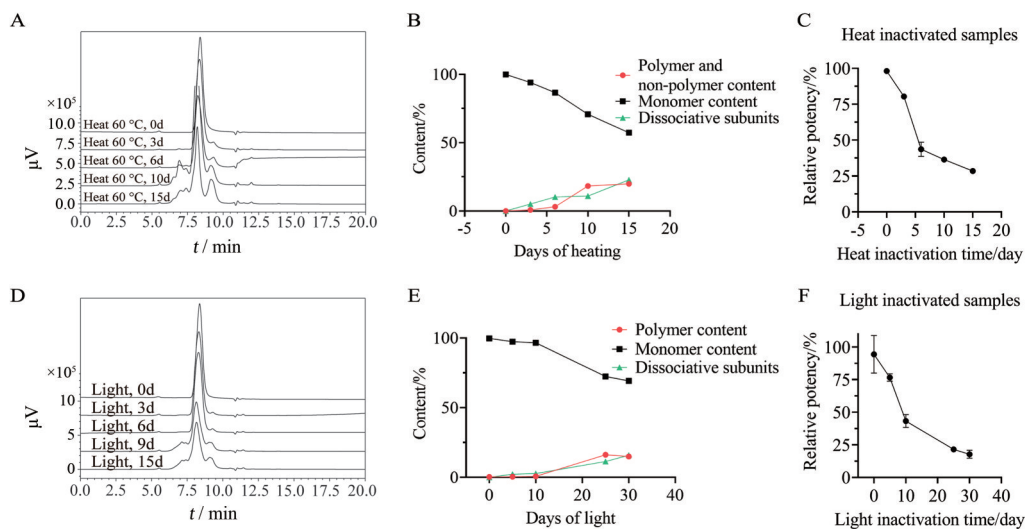


Figure 3 Heat and light inactivated study. A: SEC-HPLC chromatogram of heat inactivated samples; B: Monomer content of heat inactivated samples; C: Relative potency of heat inactivated samples; D: SEC-HPLC chromatogram of light inactivated samples; E: Monomer content of light inactivated samples; F: Relative potency of light inactivated samples

胞法的 P 值分别为 0.943 9 和 0.589 1, 均大于 0.05, 两组数据呈正态分布。对两种方法的两组数据进行配对 t 检验, P 值为 0.078 8 (> 0.05), 说明两种方法所得结果之间无显著性差异。对体内动物法和体外细胞法的结果进行 Bland-Altman 分析, 如图 4 所示, 体内法和体外法的结果偏倚为 -0.03 , 数据差值的标准差 (SD) 为 0.04, 两种方法的数据差值均在 95% 的一致性范围内, 具有良好的相关性, 初步表明两种方法可以相互替代。

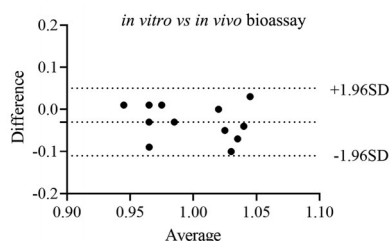


Figure 4 Comparison of *in vivo* bioassay and *in vitro* bioassay

讨论

hCG 通过调节类固醇激素合成促进睾丸和卵巢的功能, 在人类的生殖和代谢过程中是关键性的调节因子。因其能导致子宫组织增长引起子宫质量增加的反应, 中国药典 (2020 版) 使用小鼠子宫增重法对绒毛膜促性腺激素进行生物测定。随着分子生物技术的飞速发展, 有越来越多的生物活性测定方法展现在人们眼前。本研究使用的报告基因法是通过 rhCG 与受体结合后产生信号, 诱导报告基因在 CRE 序列控制下表达, 表达产物可以直接释放荧光素酶信号, 通过检测荧光素, 从而测定 rhCG 的生物活性。与传统的动物体内测定法相比, 此报告基因法具有高通量筛选、准确度高、简单快速的优点, 对于该类药物的早期研发筛选、生产工艺开发和质量检验等多方面都具有重要的意义。

本研究构建了一种荧光素酶报告基因转基因细胞株 LHCGR-CRE-Luc-HEK293, 在 HEK293 细胞中过表达 LHCGR, 转入含 CRE 的荧光素酶报告基因载体, hCG 与 LHCGR 结合引起 G 蛋白跨膜结构域的改变, 激活腺苷酸环化酶上调 cAMP, 最终激活 CRE, 调控 cAMP 信号通路, 从而表达荧光素酶报告基因, 用于定量检测。本研究建立了一种检测 hCG 生物活性的方法, 并对该方法条件进行优化与验证。由于 hCG 与 LH 具有相似的 β 亚基序列, 并且与同一受体 LHCGR 结合进行调控反应。在方法验证时, 发现 LH 也能表达出量效曲线, LH 量效曲线的拟合值 (R^2) 为 0.851, uhCG 和 rhCG 曲线的 R^2 分别达到 0.995 和 0.998, LH 曲线的拟合值与 uhCG 和 rhCG 的曲线仍有很大差别。所以相比而言, 该方法对于 hCG 的专属性比 LH 的专

属性要高。

对样品进行破坏性实验后, 使用分子排阻色谱法检测经过高温处理后的 rhCG 样品, 结果显示样品中单体含量显著下降, 检测破坏后样品的生物活性与单体含量成正比。值得注意的是, 样品经过强光分别处理 0、5、10 天后, 使用分子排阻色谱法检测样品的单体含量并没有明显下降, 而对应的样品生物活性显著下降。有研究表明, hCG 解离成 α 和 β 亚基后, 生物活性下降明显^[19]。分别对色谱图的单体、聚体和解离亚基峰进行积分, 发现在随着光照天数的增加, 解离亚基峰在第 5 天时开始出现。第 5 天出现解离亚基峰的同时, hCG 生物活性下降, 与前述研究结果一致。所以样品经过高温和强光处理后形成聚合物同时解离成 α 和 β 亚基, 可以通过高效液相色谱分离出 hCG 的 α 和 β 亚基峰, 从而对有关物质进一步确认。

本研究建立的报告基因法具有良好的专属性和精密度, 该方法与传统的动物体内实验法相比实验周期缩短、操作简便。与通过检测 cAMP 或孕酮等细胞效应产物测定 hCG 生物活性方法的结果相比^[20-22], 具有更高的灵敏度。该方法高效稳定, 有望用于质量控制, 作为动物体内法的补充和替代方法。

作者贡献: 黄盈负责实验设计、完成实验主要内容和文章撰写; 张孝明负责前期实验条件和方法学验证摸索; 李鹤洋、王绿音、张慧、吕萍负责提供技术和材料支持; 高向东、李晶、梁成罡负责指导实验设计思路、提出修改意见。

利益冲突: 全体作者均同意最终的文章, 无任何利益冲突。

References

- [1] Gordon K. New developments in gonadotrophin pharmacology [J]. *Reprod Biomed Online*, 2002, 5: 259-264.
- [2] Wei W. Biopotency and quality control of recombinant glycoprotein hormone [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2015, 24: 139-142, 194.
- [3] Study on human chorionic gonadotropin [J]. *J Peking Univ Health Sci (北京医学院学报)*, 1974, (02): 132.
- [4] Hu JG. Overview of human chorionic gonadotropin research and applications [J]. *J Youjiang Med Coll Natl Minor (右江民族医学院学报)*, 1990, (04): 43-46.
- [5] Emerson CH, Torres MT. Recombinant human thyroid-stimulating hormone: pharmacology, clinical applications and potential uses [J]. *BioDrugs*, 2003, 17: 19-38.
- [6] Cahoreau C, Klett D, Combarrous Y. Structure-function relationships of glycoprotein hormones and their subunits' ancestors [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2015, 6: 26.
- [7] Ulloa-Aguirre A, Zariñán T, Jardón-Valadez E, et al. Structure-function relationships of the follicle-stimulating hormone

- receptor [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 707.
- [8] Szkudlinski MW, Fremont V, Ronin C, et al. Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82: 473-502.
- [9] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part 4. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 193.
- [10] United States Pharmacopeia and the National Formulary [S]. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, Inc., 2021: 3366.
- [11] European Pharmacopoeia [S]. 10th Ed. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare, 2019: 2120-2121.
- [12] Artiges A. Alternatives to animals in the development and control of biological products for human and veterinary use. The role of the European Pharmacopoeia [J]. *Dev Biol Stand*, 1999, 101: 29.
- [13] Yu L, Rao CM. Research progress in bioassay of biotech drugs [J]. *Lett Biotechnol*, 2017, 28: 392-396.
- [14] Sendak RA, Wang F, Geagan LB, et al. Comparison of two *in vitro* methods for the measurement of recombinant human TSH bioactivity [J]. *Biologicals*, 2002, 30: 245-254.
- [15] Wang LY, Liang CG, Yang HM, et al. Development of a robust reporter gene-based assay for the bioactivity determination of recombinant human follicle stimulating hormone (rhFSH) pharmaceutical products [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 177: 112855.
- [16] Sun S, Wang LY, Li J, et al. Study on biological activity assay of fusion protein of rhFSH-Fc based on the reporter gene [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2022, 42: 60-67.
- [17] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part 4. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 530-535.
- [18] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part 4. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 206.
- [19] Nagy AM, Glinoe D, Picelli G, et al. Total amounts of circulating human chorionic gonadotrophin alpha and beta subunits can be assessed throughout human pregnancy using immunoradiometric assays calibrated with the unaltered and thermally dissociated heterodimer [J]. *J Endocrinol*, 1994, 140: 513-520.
- [20] Dufau ML, Pock R, Neubauer A, et al. *In vitro* bioassay of LH in human serum: the rat interstitial cell testosterone (RICT) assay [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1976, 42: 958-969.
- [21] Madanes AE, Fencel MD, Tulchinsky D. Comparison of human chorionic gonadotropin measurements by radioimmunoassay and *in vitro* bioassay [J]. *Am J Reprod Immunol Microbiol*, 1985, 9: 52-55.
- [22] Selvaraj N, Dantes A, Limor R, et al. Establishment of an *in vitro* bioassay and radio receptor assay for LH/CG in human sera using immortalized granulosa cells transfected with LH/CG receptor [J]. *Endocrine*, 1996, 5: 275-283.