

# 用于磷酸组胺检测的报告基因细胞模型构建研究

陈莉<sup>1</sup>, 陶禹<sup>2</sup>, 霍家燕<sup>3</sup>, 季文君<sup>1</sup>, 顾晓红<sup>1</sup>, 潘尔卓<sup>1</sup>, 陶金<sup>2\*</sup>, 陈卫<sup>1\*</sup> (1. 苏州市药品检验检测研究中心, 江苏 苏州 215104; 2. 苏州大学, 江苏 苏州 215031; 3. 药科元(上海)生物技术有限公司, 上海 200241)

**摘要:** **目的** 探索用于磷酸组胺检测的报告基因细胞模型构建。 **方法** 将人磷酸组胺 H1 受体(H1R)、H2 受体(H2R)的过表达质粒, 以及报告基因的 G 蛋白偶联受体亚型 G<sub>s</sub>、G<sub>i</sub> 和 G<sub>q</sub> 响应元件的载体单独或共同转染至 HEK293 细胞, 并对质粒的转染比例进行优化; 检测 H1R 或 H2R 激动剂作用后细胞内 cAMP 和 Ca<sup>2+</sup> 含量的变化验证受体的表达和功能; 对不同细胞模型经组胺作用后的化学发光值进行比较; 通过在复方氨基酸注射液、琥珀酰明胶注射液以及依诺肝素钠中添加磷酸组胺进行模拟检测, 计算回收率以验证准确性。 **结果** 共转染时 3 种质粒的比例为 1:1:10 时, 细胞对磷酸组胺的响应值较高, 后续采用此比例进行转染; 对细胞内 cAMP 和 Ca<sup>2+</sup> 含量的变化测定验证了 H1R 和 H2R 的过表达和功能; 其中过表达 H1R 和 H2R 的报告基因细胞(H1R/H2R-Luc 细胞)与单独过表达 H1R 或 H2R 的细胞相比, 当磷酸组胺浓度高于 0.64 nmol·L<sup>-1</sup> 时, 其化学发光值均高于其他组细胞( $P < 0.05$ ); 用该模型检测复方氨基酸注射液、琥珀酰明胶注射液以及依诺肝素钠中添加的磷酸组胺, 当磷酸组胺含量在 3.2~400 nmol·L<sup>-1</sup> 内时呈现良好的线性关系, 磷酸组胺的回收率在 88%~121%。 **结论** 构建的 H1R/H2R-Luc 细胞可用于磷酸组胺的检测。

**关键词:** 报告基因; 细胞模型; 组胺 H1 受体; 组胺 H2 受体

doi:10.11669/cpj.2024.11.005 中图分类号:R965 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)11-0984-06

## Construction of Reporter Gene Cell Model for Detection of Histamine Phosphate

CHEN Li<sup>1</sup>, TAO Yu<sup>2</sup>, HUO Jiayan<sup>3</sup>, JI Wenjun<sup>1</sup>, GU Xiaohong<sup>1</sup>, PAN Erzhuo<sup>1</sup>, TAO Jin<sup>2\*</sup>, CHEN wei<sup>1\*</sup> (1. Suzhou Institute for Drug Control, Suzhou 215104, China; 2. Soochow University, Suzhou 215031, China; 3. Shanghai VKEY Biotechnologies Co. Ltd, Shanghai 200241, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish the cell model of reporter gene for detecting histamine phosphate. **METHODS** The plasmids of human histamine phosphate H1 receptor (H1R), H2 receptor (H2R) and the response elements of G protein-coupled receptor alpha subunits, including G<sub>s</sub>, G<sub>i</sub> or G<sub>q</sub>, cloned with reporter gene were co-transfected into HEK293 cells. The transfected ratio of the plasmid was optimized. Subsequently, the expression and function of H1R and H2R were verified by detecting the change of cAMP content and cellular [Ca<sup>2+</sup>] after the effect of agonists. The chemiluminescence activities of HEK293 cells transfected with H1R and/or H2R under different concentrations of histamine were compared. Finally, the cell model was verified by adding histamine phosphate into compound amino acid injection, succinyl gelatin injection, and enoxaparin sodium solution to simulate the detection and calculating the recovery rate. **RESULTS** When the amount of three plasmids was 1:1:10, the response value of cells to histamine phosphate was higher, this ratio was used for subsequent transfection. The changes of cAMP and Ca<sup>2+</sup> contents in cells verified the overexpression of H1R and H2R and the function of reporter gene response element. When the concentration of histamine phosphate was higher than 0.64 nmol·L<sup>-1</sup>, the chemiluminescence value of cells overexpressing H1R and H2R reporter genes (H1R/H2R-Luc cells), was higher than that of other groups ( $P < 0.05$ ). This cell model was used to detect the histamine phosphate added in amino acid injection, succinyl gelatin injection, and enoxaparin sodium solution. The recovery rates were between 88% - 121% when the concentration of histamine phosphate was between 3.2 - 400 nmol·L<sup>-1</sup>. **CONCLUSION** The H1R/H2R-Luc cells constructed successfully in the present study would be used for the detection of histamine phosphate.

**KEY WORDS:** reporter gene; cell model; H1 histamine receptor; H2 histamine receptor

磷酸组胺杂质是导致药品在临床使用中出現低血压、过敏反应皮疹、头痛、水肿甚至休克的主要原因<sup>[1]</sup>, 由于其本身即为活性胺类物质, 可直接作用于人体细胞或受体, 因此其导致的不良反应发生大

基金项目: 江苏省市场监督管理局科技计划项目资助(KJ2022038)

作者简介: 陈莉, 女, 博士, 主任药师 研究方向: 药理毒理学 \* 通讯作者: 陶金, 男, 博士, 教授 研究方向: 生理学与神经生物学  
Tel: (0512)65880126; 陈卫, 男, 硕士, 主任药师 研究方向: 药品安全监管 Tel: (0512)67079921

多较为迅速,极易引发严重的系统性心血管不良反应,甚至危及生命<sup>[2]</sup>。

现有的检测方法主要为猫血压测定法或豚鼠离体回肠收缩测定法,这两种方法都需要使用动物或动物器官,且均为半定量的检测方法<sup>[3]</sup>。而基于报告基因的检测方法可过表达所需的人源的受体,以实现目标化合物准确、可定量以及高通量的检测<sup>[4]</sup>。

磷酸组胺受体属于 G 蛋白偶联受体(GPCR),共有 4 个亚型,已有的研究结果显示<sup>[5-7]</sup>,磷酸组胺引起的血压下降与其中的组胺 H1 受体(H1R)介导的内皮细胞 NO 的释放以及与组胺 H2 受体(H2R)介导的血管平滑肌舒张均有关联<sup>[8]</sup>。因此如何利用 H1R 和 H2R 及其信号转导通路产生的生物学效应准确有效的测量磷酸组胺的含量,是一个值得探索的方向。

据此,在报告基因技术的基础上,尝试利用 H1R 和 H2R 及其后续的信号转导通路,摸索建立可用于磷酸组胺检测的方法,并对方法可行性进行验证,为后续组胺检测用稳转细胞株的构建提供实验依据,以期建立基于组胺生物学效应的定量检测方法,为药品中组胺杂质的控制提供新的方法。

## 1 实验材料与仪器

HEK293 细胞株(ATCC,货号 CRL-1573); H1R/pCDNA3.1、H1R/pCDNA3.1 和 MRE/CRE/SRE-Luc-pGL4.40(上海捷瑞生物工程有限公司); FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂(Promega,批号:0000523755);复方氨基酸注射液(费森尤斯斯卡比华瑞制药有限公司,批号 80QL087);琥珀酰明胶注射液[贝朗医疗(苏州)有限公司,批号:2210387401];依诺肝素钠(苏州二叶制药有限公司,批号:8YN221102);DMEM 培养基(Hyclone 公司,批号:AH29865362 等);胎牛血清(Gibco 公司,批号:2254377RP); Lymphocyte serum-free medium (Tecono, L158-500,批号:220502K); Matrigel (Corning-BD); Fluo-4 Direct<sup>™</sup> 钙含量检测试剂盒(Invitrogen,货号:F10471,批号:2411515); cAMP TR-FRET kit (Vkeybio,货号:A010011,批号:20120A01); KeyTec<sup>®</sup> Enhanced Luciferase Detection Kit (Vkeybio, A2000101N,批号:20220610); CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent 检测试剂(Promega, G7572,批号:0000527329);多功能酶标仪 Spectramax iD5 及 SoftMax 分析软件(Molecular Devices 公司),流式细胞仪 FACS Calibur(BD 公司)。

## 2 方法

### 2.1 质粒共转比例摸索

HEK293 细胞使用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养,质粒转染前 1 d,将处于对数生长期的细胞用胰酶消化重悬后,以每毫升  $8 \times 10^5$  个细胞的密度接种,置于 37 °C 和体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养过夜。转染前半小时更换为不含双抗的培养基。用 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂配置质粒后加入培养的细胞中进行转染(pcDNA3.1 Neo(+)-H1R、pcDNA3.1 Hygro(+)-H2R 和 pGL4\_MRE CRE SRE\_luc2P Hygro 三种质粒的量分别为 1:1:10、1:1:4 和 1:1:2),以分别获得 H1R-Luc 细胞、H2R-Luc 细胞和 H1R/H2R-Luc 细胞,继续培养 24 h 后,加入终浓度分别为 10 000、2 000、400、80、16、3.2、0.64、0.128 和 0.026 nmol · L<sup>-1</sup> 的组胺作用 6 h 后进行化学发光的检测。

### 2.2 人磷酸组胺 2 受体(H2R)过表达验证

使用 H2R 的特异性激动剂 Dimaprit dihydrochloride 激动 H2R 受体<sup>[9]</sup>,使用 Vkeybio cAMP TR-FRET 检测试剂盒进行 cAMP 生成量测定,以验证 H2R 受体的过表达。检测原理为,当检测样品中存在未标记的 cAMP, cAMP 示踪复合物与 Rd 标记抗体的结合被阻断, Eu 激发后无法实现能量共振转移,反应体系中检测到的 665 nm 信号降低,由此来检测 cAMP 含量的变化。首先取上述 HEK293 细胞,胰酶消化后重悬细胞,以每毫升约  $1 \times 10^6$  个细胞的密度接种于 384 孔板中并分别转染不同质粒,培养约 24 h。按照试剂盒的使用说明,使用缓冲液梯度稀释 H2R 受体激动剂 Dimaprit dihydrochloride, 5 μL 每孔加入细胞中,使其终浓度分别为 2 800、700、175、43.75、10.94、2.73、0.68、0.17、0.043、0.011 和 0.002 7 nmol · L<sup>-1</sup>, 37 °C 孵育 30 min 后进行 cAMP 生成量测定。

### 2.3 人磷酸组胺 1 受体(H1R)过表达验证

采用检测钙流的方法进行 H1R 过表达的验证。取上述 HEK293 细胞,胰酶消化后以约每毫升  $8 \times 10^5$  个细胞的密度接种于 384 孔板中并分别转染不同质粒,培养约 24 h。按照试剂盒使用说明配置 Fluo-4 Direct<sup>™</sup> 钙含量检测试剂,弃去细胞板中的培养基后,加入检测试剂, 37 °C 孵育 1 h,加入不同浓度的磷酸组胺梯度溶液 5 μL 后(终浓度分别为 100、25、6.25、1.56、0.39、9.77  $\times 10^{-2}$ 、2.44  $\times 10^{-2}$ 、6.10  $\times 10^{-3}$ 、1.53  $\times 10^{-4}$ 、3.81  $\times 10^{-4}$  和 9.54  $\times 10^{-5}$  μmol · L<sup>-1</sup>),立即放入多功能酶标仪中读板(激发波长为

485 nm,发射波长为 525 nm)。

## 2.4 报告基因响应值的比较

为比较表达有不同受体的细胞对磷酸组胺检测的效果,还检测了 H1R 细胞、H2R 细胞和 H1R/H2R-Luc 细胞三种细胞对不同浓度磷酸组胺的响应。取上述 HEK293 细胞,以约每毫升  $2 \times 10^5$  个细胞的密度接种 96 孔,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,置 37  $^\circ\text{C}$  体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 6 h,待细胞贴壁后,分别转染不同质粒并继续培养 24 h,随后移除完全培养基后更换 100  $\mu\text{L}$  每孔无血清培养基,37  $^\circ\text{C}$  体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中饥饿过夜,加入不同浓度的磷酸组胺,使其终浓度分别为 10 000、2 000、400、80、16、3.2、0.64 和 0.128  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  以及磷酸组胺的对照品溶液,替换培养板中的培养基培养 6 小时,随后每孔加入 100  $\mu\text{L}$  KeyTec<sup>®</sup> Enhanced Luciferase Detection Kit,读取 Luminescence 的值。

## 2.5 样品中磷酸组胺含量的检测

采用添加有不同浓度磷酸组胺对照品的复方氨基酸注射液(AA)、琥珀酰明胶注射液(Gel)以及依诺肝素钠(enoxaparin)进行模拟检验,对细胞模型进行验证。为排除样品对细胞活性的影响,试验首先通过细胞毒性试验,选取无细胞毒性的供试品剂量。HEK293 细胞以约每毫升  $2 \times 10^5$  个细胞的密度接种至 96 孔细胞板,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,置 37  $^\circ\text{C}$  体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 6 h,待细胞贴壁后,分别转染不同质粒并继续培养 24 h,随后移除完全培养基后更换 100  $\mu\text{L}$  每孔无血清培养基,在 37  $^\circ\text{C}$  和 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中饥饿过夜,将复方氨基酸注射液、琥珀酰明胶注射液以及依诺肝素钠用无血清培养基溶解或稀释成不同的浓度,替换培养板中的培养基培养 6 h,随后每孔加入 100  $\mu\text{L}$  CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent 检测试剂,多功能酶标仪读数,以检测细胞活力。随后选取无细胞毒性的复方氨基酸注射液、琥珀酰明胶注射液以及依诺肝素钠溶液加入不同浓度的磷酸组胺溶液(磷酸组胺终浓度分别为 10 000、2 000、400、80、16、3.2、0.64 和 0.128  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),同时设同浓度的磷酸组胺组作为参照,替换培养板中的培养基培养 6 小时,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  KeyTec<sup>®</sup> Enhanced Luciferase Detection Kit,读取 Luminescence 的值。

## 3 结果

### 3.1 质粒共转比例摸索

为了在共转染时获得更高的响应,对 pcDNA3.1 Neo(+)-H1R 和 pcDNA3.1 Hygro(+)-

H2R 质粒与报告基因 pGL4\_MRE CRE SRE\_luc2P Hygro 载体的共转染量进行了探索。实验设置了 3 组转染比例,pcDNA3.1 Neo(+)-H1R、pcDNA3.1 Hygro(+)-H2R 和 pGL4\_MRE CRE SRE\_luc2P Hygro 分别为 1:1:10、1:1:4 和 1:1:2,结果表明(图 1),在阳性对照品磷酸组胺的刺激下,三种质粒的量为 1:1:10 时磷酸组胺作用后信号响应较高,因此在后续质粒共转染时,采用过表达质粒的与报告基因的质粒的比例为 1:1:10(三种质粒时)或 1:5(两种质粒时)进行转染。

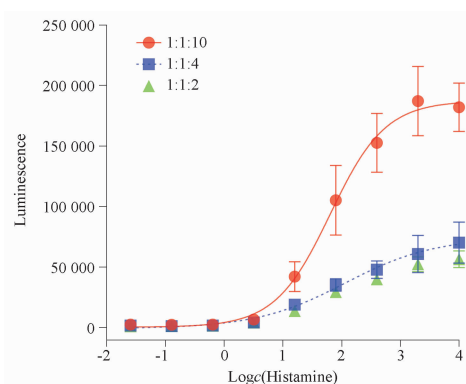


图 1 不同的质粒转染比例对转染后细胞的化学发光响应值的影响.  $n=3, \bar{x} \pm s$

Fig. 1 Effects of different plasmid transfection ratios on the chemiluminescence response of transfected cells.  $n=3, \bar{x} \pm s$

### 3.2 H2R 过表达验证

H2R 受体被激活后,会活化 G 蛋白偶联受体的亚型  $G_s$ ,继而使 cAMP 的含量上升<sup>[10-11]</sup>,因此细胞内 cAMP 的定量测定可用于验证 H2R 受体的过表达以及细胞内报告基因响应元件的功能。结果显示(图 2),当 H2R 激动剂 Dimaprit dihydrochlorid 的浓度高于 0.002 7  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,H1R/H2R-Luc 细胞内的 cAMP 含量即开始升高,约至 43.75  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时含量达到最大,EC<sub>50</sub> 值为 0.39  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;转染 pcDNA3.1 Neo(+)-H1R 的细胞(H1R 细胞)仅在 Dimaprit dihydrochlorid 的浓度高于 2.73  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时才出现 cAMP 含量的增加,至 43.75  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时 cAMP 含量达到最高,且增加量较小,仅为 H1R/H2R-Luc 细胞变化量的约 1/5,EC<sub>50</sub> 值为 10.42  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;Luc 细胞在磷酸组胺浓度为 0.002 7 ~ 2 800  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  内未观察到细胞内 cAMP 含量的明显增加。

### 3.3 H1R 过表达验证

H1R 激活后,经 G 蛋白偶联受体 Gq 亚型的

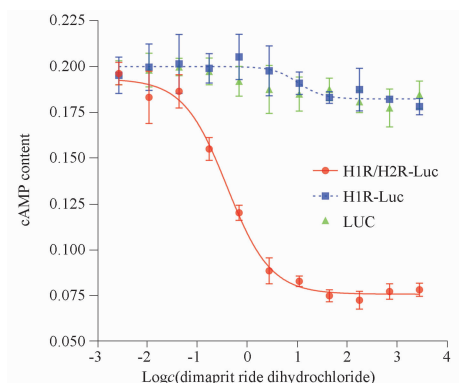


图2 不同浓度的 dimaprit dihydrochloride 作用后细胞中 cAMP 含量的变化.  $n=3, \bar{x} \pm s$

Fig. 2 Changes of cAMP content in cells treated by dimaprit dihydrochloride at different concentrations.  $n=3, \bar{x} \pm s$

偶联作用会激活膜内磷脂酶 C (PLC), 使磷脂酰二磷酸肌醇( $PIP_2$ )分解, 生成三磷酸肌醇( $IP_3$ )和二酰甘油(DG)。 $IP_3$  和 DG 作为第二信使与内质网外膜上的  $Ca^{2+}$  通道结合, 使内质网释放  $Ca^{2+}$  入胞质, 导致胞质内  $Ca^{2+}$  浓度明显增加<sup>[12]</sup>, 因此实验通过测定细胞钙流方法证明 H1R 存在过表达。结果显示(图 3), 当磷酸组胺的浓度高于  $6.10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, H1R/H2R-Luc 细胞内的钙离子在开始升高, 约至  $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时含量达到最大,  $EC_{50}$  值为  $0.18 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 转染 pcDNA3.1 Hygro (+)-H2R 的细胞 (H2R 细胞) 仅在磷酸组胺浓度高于  $0.39 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时才出现钙离子含量的增加, 且增加量较小, 约为 H1R/H2R-Luc 细胞变化量的 1/5,  $EC_{50}$  值为  $5.47 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; Luc 细胞在磷酸组胺浓度为  $9.54 \times 10^{-5} \sim 100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  内未观察到细胞内钙离子含量的增加。

### 3.4 报告基因响应值的比较

比较三种磷酸组胺检测模型 H1R-Luc 细胞、H2R-Luc 细胞以及 H1R/H2R-Luc 细胞的报告基因响应对各浓度磷酸组胺的化学发光值(图 4), 结果显示三种类型的细胞在磷酸组胺为  $16 \sim 400 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  内其化学发光值 (luminescence) 均随磷酸组胺浓度的升高而升高, 且当磷酸组胺浓度高于  $0.64 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, H1R/H2R-Luc 细胞的化学发光值与 H1R-Luc 细胞和 H2R-Luc 细胞相比均具有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

### 3.5 磷酸组胺含量的检测

细胞毒性结果显示(图 5A ~ C), 复方氨基酸注射液浓度低于 5%、琥珀酰明胶注射液浓度低于 60% 以及依诺肝素钠溶液浓度低于  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,

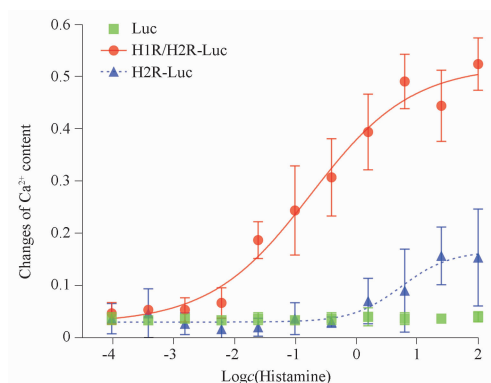


图3 不同浓度的磷酸组胺作用后细胞中钙离子含量的变化.  $n=3, \bar{x} \pm s$

Fig. 3 Changes of  $Ca^{2+}$  content in cells treated by histamine phosphate at different concentrations.  $n=3, \bar{x} \pm s$

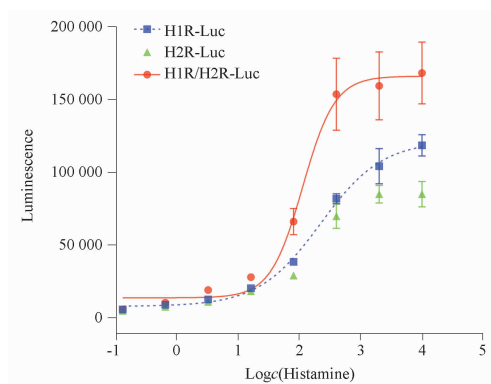


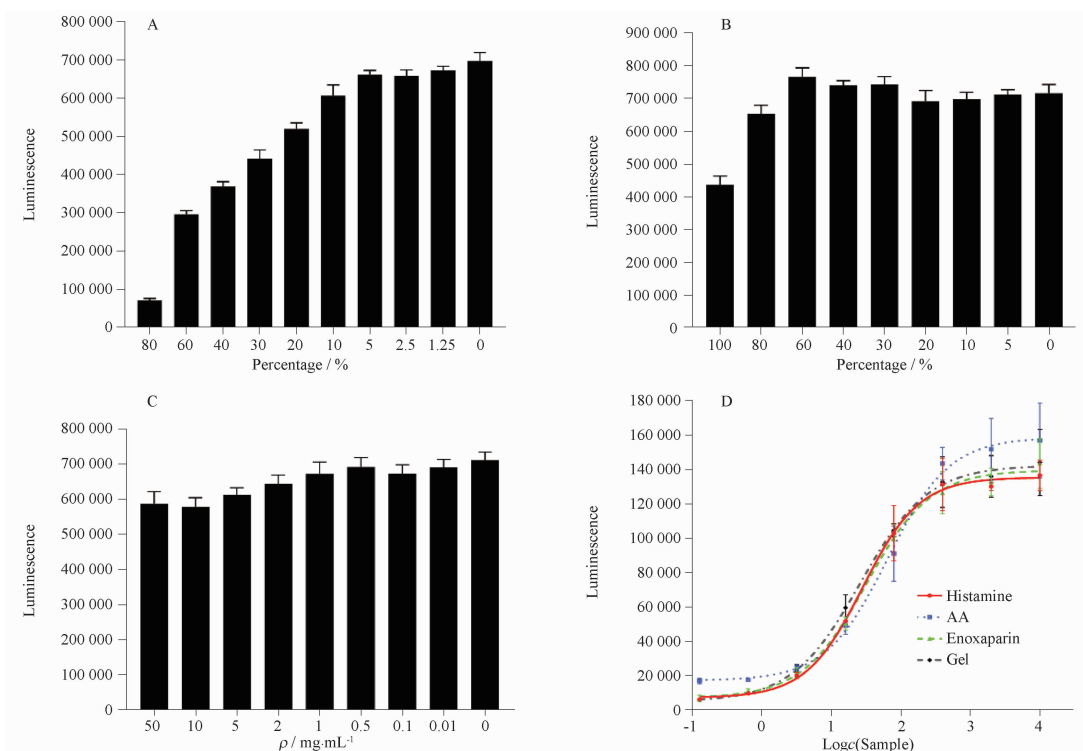
图4 不同细胞模型对磷酸组胺的响应.  $n=3, \bar{x} \pm s$

Fig. 4 Response of different cell models to histamine phosphate.  $n=3, \bar{x} \pm s$

细胞活力与空白对照组无显著性差异, 因此后续实验分别选用 5%、60% 和  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度作为上述样品的终浓度。采用添加有不同浓度磷酸组胺的复方氨基酸注射液、琥珀酰明胶注射液以及依诺肝素钠溶液进行模拟检测, 结果显示(图 5D), 磷酸组胺含量在  $3.2 \sim 400 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  内呈现良好的线性关系, 上述三种样品溶液磷酸组胺的回收率在 88% ~ 121%。

## 4 讨论

磷酸组胺是公认的一种过敏反应介质, 临床上摄入超过一定量便会引起低血压、过敏性皮疹、头痛和水肿等不良反应, 严重时甚至导致休克和死亡<sup>[13]</sup>。此外磷酸组胺的类似物也可能诱发类似的反应<sup>[3]</sup>。因此建立准确的磷酸组胺及其类似物的检测方法将有利于减少药品的不良反应, 提高药品的质量。依据已有的研究结果<sup>[5-7]</sup>, 磷酸组胺导致的



A - 复方氨基酸注射液的细胞毒性; B - 琥珀酰明胶注射液的细胞毒性; C - 依诺肝素钠溶液的细胞毒性; D - 复方氨基酸注射液、琥珀酰明胶注射液和依诺肝素钠溶液中磷酸组胺含量的检测结果。

A - Cytotoxicity test result of Amino Acid Injection; B - Cytotoxicity test result of Succinyl Gelatin Injection; C - Cytotoxicity test result of Enoxaparin Sodium solutions; D - Histamine phosphate determination results of Amino Acid Injection (AA), Succinyl Gelatin Injection (Gel) and Enoxaparin Sodium solutions (Enoxaparin).

图5 复方氨基酸注射液(AA)细胞毒性实验结果.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 5 Cytotoxicity test results and results of amino acid injection (AA).  $n = 3, \bar{x} \pm s$

血压下降和过敏等不良反应,与 H1R 和 H2R 均相关<sup>[14]</sup>,因此,建立共表达 H1R 和 H2R 的报告基因细胞模型来进行磷酸组胺及其类似物的定量检测,以提高药品的安全性。

对转染的方法进行摸索,比较了 3 种质粒或载体 (pcDNA3.1 Neo (+)-H1R、pcDNA3.1 Hygro (+)-H2R 和 pGL4\_MRE CRE SRE\_luc2P Hygro 的不同转染比例,以寻找转染效率较高的比例,最后根据化学发光值的测定结果,选择了三种质粒的比例为 1:1:10 进行后续的转染。

对转染得到的细胞进行功能验证。由于 H1R 或 H2R 关联的与磷酸组胺不良反应相关的信号转导通路有所不同,在内皮细胞依赖的途径中,主要为 H1R 与 G 蛋白偶联受体 q(Gq) 偶联,激活下游信使三磷酸肌醇和二酰甘油,前者可激活细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  通道,活化氮氧化物合成酶合成 NO,引起血管扩张。在平滑肌细胞依赖的途径中,主要为 H2R 与 G 蛋白偶联受体 s(Gs) 偶联,主要通过激活 cAMP 信号通路,引起血管舒张。因此通过 H2R 特异性激动剂 Dimaprit dihydrochlorid 和磷酸组胺刺激后细胞内

cAMP 和钙离子含量的变化,来确定 H1R 和/或 H2R 的过表达以及报告基因的功能。结果显示,在 H1R 和 H2R 共同共表达的细胞中,细胞内的 cAMP 含量在高于  $0.0027 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Dimaprit dihydrochlorid 的作用下开始增加,至  $43.75 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时含量不再明显增加,  $\text{EC}_{50}$  为  $0.39 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 相对地,仅过表达 H1R 的细胞虽然在  $3.2$ 、 $16$  和  $80 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时 cAMP 含量也出现了升高,但升高幅度较小,  $\text{EC}_{50}$  为  $10.42 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。说明在转染后的细胞中, H2R 已正确过表达,且信号转导功能正常。另外还说明 H1R 也可以介导细胞内 cAMP 含量的变化,但作用较弱。在 H1R/H2R-Luc 细胞中,细胞内的钙离子在  $6.10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的磷酸组胺作用下开始增加,至  $25$  和  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时胞内含量达到最大,  $\text{EC}_{50}$  值为  $0.13 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 而在 H2R-Luc 细胞中,钙离子含量的增加仅在磷酸组胺浓度高于  $0.39 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时才出现,但增加幅度同样较小,  $\text{EC}_{50}$  值为  $5.47 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由此推测在转染后的细胞中, H1R 已成功过表达,且功能正常。另外,还可以推断 H2R 受体也可以介导信号通路中钙离子含量的变

化,但作用较弱。上述两项验证实验也再次证实了磷酸组胺激动的 H1R 和 H2R 信号通路并非完全独立,存在交叉作用,与其他关于 G 蛋白偶联受体的研究结果一致<sup>[15]</sup>。当磷酸组胺的浓度较低时,磷酸组胺可能主要通过激动 H1R 增加细胞内的钙离子浓度,而当磷酸组胺浓度较大时,磷酸组胺还会通过激动 H2R 增加钙离子浓度,发挥生物效应。

此外,比较 H1R/H2R-Luc 细胞与 H1R-Luc 或 H2R-Luc 细胞对磷酸组胺作用后报告基因化学发光值的差异,发现 H1R/H2R-Luc 细胞对磷酸组胺的刺激具有更高的响应值。最后采用构建的 H1R/H2R-Luc 细胞模型对添加有不同浓度磷酸组胺的复方氨基酸注射液、琥珀酰明胶注射液以及依诺肝素钠溶液进行了模拟检验,结果显示上述 3 种样品中磷酸组胺含量在  $3.2 \sim 400 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  内呈现良好的线性关系,上述三种供试品溶液磷酸组胺的回收率在  $88\% \sim 121\%$ ,能够较为准确地检测磷酸组胺的含量。本研究首次验证了基于 H1R 和 H2R 受体的组胺检测细胞模型,可以为后续组胺检测用稳转细胞株的构建提供实验依据,且该模型理论上还能用于经 H1R 或 H2R 受体产生不良反应的组胺类似物的测定。

## REFERENCES

- [ 1 ] FEDDERN V, MAZZUCO H, FONSECA F N, *et al.* A review on biogenic amines in food and feed: toxicological aspects, impact on health and control measures [J]. *Anim Prod Sci*, 2019, 59 (4):608-618.
- [ 2 ] HE H H, ZENG J P, WANG W J, *et al.* Feasibility of histamine inspection method for clindamycin phosphate injection [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2022, 57(9): 736-740.
- [ 3 ] LIN X L, WU Y N, TAN L, *et al.* Pharmacological and physico-chemical determination of biogenic amines [J]. *Cent South Pharm*(中南药理学), 2022, 20 (7):1617-1624.
- [ 4 ] LIU L Z, WANG C, WANG M R, *et al.* Application of HL60/NF- $\kappa$ B pyrogen reporter gene assay in detection of pyrogen in monoclonal antibodies [J]. *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志), 2022, 53 (2):202-207.
- [ 5 ] HILL S J. Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor [J]. *Pharmacol Rev*, 1990, 42(1):45-82.
- [ 6 ] BEDARIDA G, BUSHHELL E, BLASCHKE T F, *et al.* H1-and H2 - histamine receptor-mediated vasodilation varies with aging in humans [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1995, 58(1):73-80.
- [ 8 ] NAYLOR A, SHARIFFI B, GILLUM T L, *et al.* Effects of combined histamine H and H receptor blockade on hemodynamic responses to dynamic exercise in males with high-normal blood pressure [J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2020, 45(7):769-776.
- [ 7 ] LAURENCE B, RANDA H, BJORN K. *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics* [M]. 13th ed. New York: McGraw-Hill, 2017:711-726.
- [ 9 ] TAMADDONFARD E, ERFANPARAST A, GHASEMI H, *et al.* The role of histamine H1, H2 and H3 receptors of ventral posteromedial nucleus of thalamus in modulation of trigeminal pain [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 791: 696-702.
- [ 10 ] MARUKO T, NAKAHARA T, SAKAMOTO K, *et al.* Involvement of the  $\beta\gamma$  subunits of G proteins in the cAMP response induced by stimulation of the histamine H1 receptor [J]. *N-S Arch Pharmacol*, 2005, 372(2):153-159.
- [ 11 ] CARSON M R, SHASBY S S, SHASBY D M. Histamine and inositol phosphate accumulation in endothelium: cAMP and a G protein [J]. *Am J Physiol*, 1989, 257(4):259-264.
- [ 12 ] HISHINUMA S, OGURA K.  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-mediated regulation of the desensitizing process in G(q) protein-coupled histamine H(1) receptor-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  responses in human U373 MG astrocytoma cells [J]. *J Neurochem*, 2000, 75 (2):772-781.
- [ 13 ] IWASAKI N, TERAWAKI S, SHIMIZU K, *et al.* Th2 cells and macrophages cooperatively induce allergic inflammation through histamine signaling [J]. *PLoS One*, 2021, 16(3):e0248158.
- [ 14 ] TRIPATHI T, KHAN A A, SHAHID M, *et al.* Biochemical and histopathological evaluation of histamine receptors (H1R, H2R, H3R and H4R)-agonist in rabbits [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2013, 65(3):271-275.
- [ 15 ] KÜHN B, SCHMID A, HARTENECK C, *et al.* G proteins of the Gq family couple the H2 histamine receptor to phospholipase C [J]. *Mol Endocrinol*, 1996, 10(12):1697-1707.

(收稿日期:2023-03-01)