

组胺 H1 受体拮抗剂高通量筛选模型的建立及应用

史丽颖^{1*}, 陈瑶¹, 丁辉¹, 冯宝民¹, 索天娇², 张秀莉³, 梁鑫淼³

¹大连大学药物研究所, 大连 116622; ²辽宁中医药大学, 大连 116600;

³中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023

摘要: 组胺 H1 受体拮抗剂被用于治疗某些过敏性疾病, 如鼻炎、荨麻疹和过敏性皮炎。本文采用无标记细胞整合药理学技术建立了组胺 H1 受体拮抗剂高通量筛选模型。应用基于共振波导光栅的动态质量重置分析方法检测了已知的激动剂和拮抗剂作用于 A431 细胞上内源性 H1 受体后所产生的特征信号, 获取特征信号谱, 建立组胺 H1 受体拮抗剂筛选模型。进而应用此模型筛选了 32 个天然产物对组胺 H1 受体的拮抗活性。结果表明, 无标记 DMR 分析适合于 H1 受体拮抗剂的高通量筛选; 在筛选的 32 个化合物中, 从亚贡中分离得到的内酯类化合物为活性较强的拮抗剂。上述结果表明, 无标记 DMR 分析可能成为组胺 H1 受体拮抗剂发现的新方法。

关键词: 组胺; H1 受体; 拮抗剂; 筛选

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.03.019

Establishment and Application of High Throughput Screening Model for H1R Antagonists

SHI Li-ying^{1*}, CHEN Yao¹, DING Hui¹, FENG Bao-min¹, SUO Tian-jiao², ZHANG Xiu-li³, LIANG Xin-miao³

¹Institute of Materia Medica, Dalian University, Dalian 116622, China; ²Liaoning University of Traditional

Chinese Medicine, Dalian 116600, China; ³Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian, 116023, China

Abstract: The H1R antagonists are used in the treatment of several allergic conditions, such as rhinoconjunctivitis, urticaria and atopic dermatitis. Here we reported a label-free cell phenotypic profiling model for high throughput screening of H1R antagonists. Resonant waveguide grating enabled dynamic mass redistribution (DMR) assay was used to characterize the endogenous H1R in A431 cell using known agonists and antagonists. To further identify potential natural products as H1R antagonists, 32 natural products were screened using label-free DMR assay. Results showed that label-free DMR assay was suitable for high throughput screening of H1R antagonists; Among 32 compounds, two lactone compounds which isolated from *Smalanthus sonchifolius* were found to be more potent antagonist in DMR assay. These results suggested that label-free DMR assay might represent a new approach for the discovery of H1R antagonists.

Key words: histamine; H1 receptor; antagonist; screening

组胺通常以非活化状态存在于肥大细胞和嗜碱性粒细胞中, 当受到创伤和抗原抗体反应等外界刺激后, 以活化的形式释放出细胞外, 参与炎症反应。组胺通过与组胺受体结合而发挥其生理作用。人体内的组胺受体可以分为 4 型: H1、H2、H3、H4 受体。这 4 种类型组胺受体均是 G 蛋白偶联受体 (G-protein-coupled receptors, GPCRs), 通过 G 蛋白转导细胞外信号至细胞内第二信号系统。组胺介导的变应性炎症效应主要是结合 H1 受体, 引起皮肤黏膜充

血、水肿和瘙痒等, 剂量较大的情况下, 引起平滑肌收缩、全身毛细血管扩张和通透性增加, 表现为哮喘、过敏性休克、心动过速、皮肤潮红和鼻充血等^[1-3]。

H1 受体拮抗剂通过竞争性地与 H1 受体结合而阻断组胺与 H1 受体的结合, 从而抑制组胺发挥生物学效应途径^[4]。这是药物发挥抗变态反应作用的主要机制。由于组胺同时参与变态反应中的速发相和迟发相反应, 因此抗组胺药物对于治疗速发相和迟发相症状均有意义。

无标记细胞靶点药理学筛选技术具有高灵敏度、无标记和无伤害等特点, 其原理是通过共振波导光栅 (resonant wave guide grating, RWG) 生物传感器

收稿日期: 2016-05-18 接受日期: 2016-09-02

基金项目: 国家自然科学基金 (81473436, 31270398)

* 通讯作者 Tel: 86-411-87402107; E-mail: shiliying@dlu.edu.cn

将药物作用于膜受体后引发细胞内动态的物质重置 (dynamic mass redistribution, DMR) 信号转变成光的波长位移信号^[5-7]。现已广泛应用于受体生物学的研究^[8,9]和药物的发现^[10,11]。本研究采用无标记细胞靶点药理学技术,通过检测已知的激动剂和拮抗剂作用于 A431 细胞上内源性 H1 受体后所产生的特征信号,获取特征信号谱,建立组胺 H1 受体拮抗剂筛选模型。进而应用此模型筛选了 32 个天然产物对组胺 H1 受体的拮抗活性,以期为从天然产物中发现组胺 H1 受体拮抗剂提供可借鉴的实验方法。

1 材料与方法

1.1 材料

组胺、阿司咪唑、氯雷他定购自 Sigma 公司;化合物:阔马酸(1)、4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮(2)、牛蒡苷元(3)、沼菊素(4)、Uvedalin(5)、白术内酯 I(6)、白术内酯 II(7)、白术内酯 III(8)、芦丁(9)、绿原酸(10)、槲皮素(11)、大黄酸(12)、氧化苦参碱(13)、金丝桃苷(14)、盐酸掌叶防己碱(15)、补骨脂素(16)、盐酸小檗碱(17)、大黄素(18)、大黄酚(19)、苦参碱(20)、柚皮苷(21)、牛蒡苷(22)、人参皂苷 Re(23)、人参皂苷 Rg₁(24)、人参皂苷 Rh₁(25)、人参皂苷 Rd(26)、人参皂苷 Rb₁(27)、人参皂苷 Rb₂(28)、人参皂苷 Rb₃(29)、人参皂苷 Rc(30)、人参皂苷 Rg₃(31)、齐墩果酸(32)由辽宁中医药大学窦德强教授提供;DMSO 购买自 Bio Basic 公司;HBSS 和 McCoy's 5A 培养液购自 Gibco 公司;Epic[®] 384 孔生物感应器微型板购自 Corning 公司。

1.2 细胞培养

A-431 人表皮癌细胞从中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库获得(中国,上海)。A-431 细胞用含有 10% 的胎牛血清、100 U/mL 氨苄青霉素、100 μg/mL 硫酸链霉素的 DMEM 培养基(GIBCO, 货号 12800017, 含 D-Glucose 4500.0 mg/L, 添加 NaHCO₃ 1.5 g/L), 在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.3 无标记细胞靶点药理学实验

A-431 细胞以 2 × 10⁴ 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 的培养箱中培养 24 h,然后用不含 FBS 的培养基饥饿处理 24 h,检测前用 HBSS 缓冲液洗 2 次,再在每孔中加入 30 μL HBSS 缓冲液,置于 Epic[®] 系统上平衡孵育 1 h。平衡后首先在 Epic[®] 系统上建立一个 2 min 的基线,然后加入 10 μL 待测化合物,继续监测

30 min, 然后加入 10 μL 的组胺继续监测 30 min。通过监测组胺引起的 DMR 响应信号是否被预处理时加入的待测化合物所抑制来判断化合物对组胺 H1 受体的拮抗活性。

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 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。正文部分描述的 EC₅₀ 和 IC₅₀ 基于加入化合物 30 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。

2 结果与分析

2.1 组胺 H1 受体拮抗剂高通量筛选模型的建立

第一步:将组胺(最高工作浓度 32 μM, 2 倍稀释, 13 个浓度梯度)、阿司咪唑(最高工作浓度 1 μM, 2 倍稀释, 19 个浓度梯度)、氯雷他定(最高工作浓度 8 μM, 2 倍稀释, 19 个浓度梯度)分别加入已接种 A-431 细胞的 Epic[®] 384 孔生物感应器微型板中,在 Epic[®] 系统上监测 30 min, 得化合物 DMR 响应曲线。第二步:加入同一浓度组胺后继续监测 30 min, 得组胺 DMR 响应曲线。

2.1.1 组胺 H1 受体激动剂引起的 DMR 响应信号

组胺在 A-431 细胞上能够引起 DMR 响应信号,且呈剂量依赖性,EC₅₀ 为 1.29 μM; 以不同浓度的组胺预处理后再加入同一浓度的组胺,组胺的 DMR 响应信号被抑制,预处理时组胺的浓度越高第二步组胺的 DMR 响应信号被抑制的越明显,呈剂量依赖性,IC₅₀ 为 0.59 μM(图 1)。这说明 A-431 细胞上

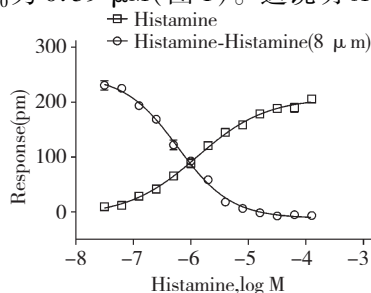


图 1 组胺引起的 DMR 信号的量效关系曲线;组胺预处理剂量与 8 μM 组胺引起的 DMR 信号的量效关系曲线

Fig. 1 The relationship of dose and DMR response of histamine; the relationship of pretreatment dose of histamine and DMR response of 8 μM histamine

存在组胺受体,组胺与受体结合后引起 DMR 信号响应,且再次加入组胺后,组胺的激动作用被脱敏。

2.1.2 组胺 H1 受体拮抗剂引起的 DMR 响应信号

阿司咪唑、氯雷他定为组胺 H1 受体拮抗剂,以不同浓度的阿司咪唑或氯雷他定处理 A-431 细胞后,再加入 16 μM 组胺(EC_{80}),组胺引起的 DMR 响应信号被抑制,且拮抗剂的浓度越高抑制越强,呈剂量依赖性,两种拮抗剂的抑制活性阿司咪唑($\text{IC}_{50} = 0.01 \mu\text{M}$)强于氯雷他定($\text{IC}_{50} = 0.18 \mu\text{M}$),见图 2。

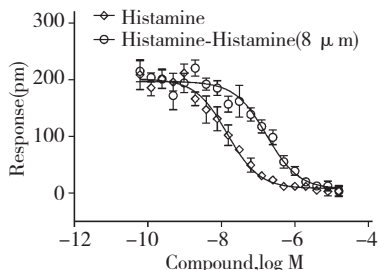


图 2 组胺 H1 受体拮抗剂预处理剂量与 16 μM 组胺引起的 DMR 信号的量效关系曲线

Fig. 2 The relationship of pretreatment dose of H1R antagonists and DMR response of 16 μM histamine

A-431 细胞天然高表达组胺 H1-4 受体中的 H1 受体^[12],因此上述结果提示采用无标记细胞靶点药理学技术可以成功监测组胺激动 A-431 细胞上 H1 受体所引起的 DMR 响应信号、组胺被组胺受体激动剂脱敏的 DMR 响应信号和组胺被组胺受体拮抗剂所拮抗的 DMR 响应信号。由此成功建立组胺 H1 受体拮抗剂筛选方法:首先监测待筛选化合物预处理 A-431 细胞所引起的 DMR 响应信号,如果待测化合物不引起 DMR 响应信号,则继续加入组胺监测组胺所引起的 DMR 响应信号被待测化合物拮抗的程度,判断待测化合物对组胺 H1 受体的拮抗活性。

2.2 组胺 H1 受体拮抗剂高通量筛选模型的应用

2.2.1 待测化合物的组胺 H1 受体拮抗活性筛选

采用无标记细胞靶点药理学筛选技术对 32 个待测化合物的组胺 H1 受体拮抗活性进行了筛选。首先,将 10 μL 待测化合物(最高工作浓度 64 μM ,2 倍稀释,2 个浓度梯度)加入已接种 A-431 细胞的 Epic[®] 384 孔生物感应器微型板中,在 Epic[®] 系统上监测 30 min,然后加入 10 μM 组胺(8 μM)继续监测 30 min,以第二步加入组胺后 30 min 内引起的最大 DMR 响应信号值作图。如图 3 所示,经牛蒡苷元、沼菊素、Uvedalin、大黄酸处理后,再加入组胺所引起

的 DMR 信号与对照组预处理后再加入组胺所引起的 DMR 信号相比明显降低,为后者的 80% 以下,由此推断牛蒡苷元、沼菊素、Uvedalin、大黄酸可能为组胺 H1 受体的拮抗剂,进而我们对上述 4 个化合物的组胺 H1 受体拮抗活性进行了量效关系考察。

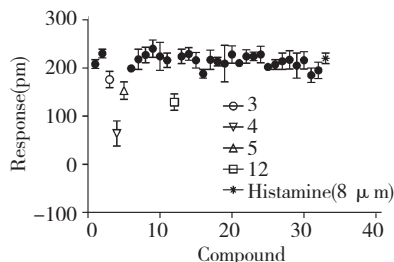


图 3 化合物(32 μM)预处理后组胺(8 μM)在 A-431 细胞上引起的最大 DMR 响应

Fig. 3 The maximum DMR responses of 8 μM histamine in A431 cells after pretreated with 32 μM compounds respectively

2.2.2 活性化合物对组胺 DMR 响应信号的影响

活性筛选结果显示牛蒡苷元(3)、沼菊素(4)、Uvedalin(5)、大黄酸(12)可能具有组胺 H1 受体拮抗活性,因此我们对其进行了量效关系考察。以 10 μL 待测化合物(最高工作浓度 64 μM ,2 倍稀释,7 个浓度梯度)处理 A-431 细胞后,再加入 16 μM 组胺(EC_{80}),组胺引起的 DMR 响应信号被抑制,且化合物浓度越高抑制作用越强,呈剂量依赖性,推测其为组胺 H1 受体拮抗剂。其中化合物沼菊素(4)和 Uvedalin(5)是从亚贡叶中分离得到的内酯类化合物,这与亚贡叶中倍半萜内酯类化合物被发现具有抗炎作用^[13]相吻合,同时对阐明亚贡叶抗炎作用机理具有重要意义。

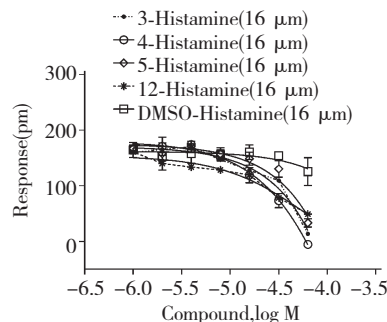


图 4 化合物预处理剂量与 16 μM 组胺引起的 DMR 信号的量效关系曲线

Fig. 4 The relationship of pretreatment dose of compounds and DMR response of 16 μM histamine

3 讨论与结论

无标记细胞靶点药理学筛选技术利用生物传感器将配体诱导的活细胞总体的变化转换为光学信号,分析的是多信号通路的综合效应而非孤立的单信号转导,能在靶标特异性、有效性和作用模式(即激动作用、拮抗作用、反向激动作用)方面进行分子的药理学定性。本文通过采用无标记细胞靶点药理学技术监测组胺作用于 A-431 细胞后引起的 DMR 响应信号,再次以组胺作用于 A-431 细胞后引起的 DMR 响应信号呈剂量依赖性脱敏,证明 A-431 细胞上高表达 H1 受体,且受体激动后引起的 DMR 响应信号可成功被监测。以特异性组胺 H1 受体拮抗剂预处理 A-431 细胞不引起 DMR 响应信号,但再次加入组胺后 DMR 响应信号被剂量依赖性地拮抗。而且 A-431 细胞天然高表达 H1 受体,而不表达 H2 受体,所以此方法可以用于 H1 受体拮抗剂的筛选。

参考文献

- 1 Marone G, Granata F, Spadaro G, et al. The histamine-cytokine network in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 112(4 Suppl):83-88.
- 2 MacGlashan D. Histamine: A mediator of inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 112(4 Suppl):53-59.
- 3 Simons FE. Advances in H1-antihistamines. *N Engl J Med*, 2004, 351:2203-2217.
- 4 Simons FE, Simons KJ. The pharmacology and use of H1-re-

ceptor-antagonist drugs. *N Engl J Med*, 1994, 330: 1663-1670.

- 5 Fang Y, Ferrie AM, Fontaine NH, et al. Resonant waveguide grating biosensor for living cell sensing. *Biophys J*, 2006, 91: 1925-1940.
- 6 Kenakin TP. Cellular assays as portals to seven-transmembrane receptor-based drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8:617-626.
- 7 Fang Y. The development of label-free cellular assays for drug discovery. *Expert Opin Drug Dis*, 2011, 6:1285-1298.
- 8 Sun H, Wei Y, Deng H, et al. Label-free cell phenotypic profiling decodes the composition and signaling of an endogenous ATP-sensitive potassium channel. *Sci Rep*, 2014, 12: 4934.
- 9 Deng H, Hu H, Fang Y. Multiple tyrosine metabolites are GPR35 agonists. *Sci Rep*, 2012, 2:373.
- 10 Fang Y. Label-free cell-based assays with optical biosensors in drug discovery. *Assay Drug Dev Technol*, 2006, 4: 583-595.
- 11 Fang Y. Guest Editor's Introduction: Label-free optical biosensors to cell biology and drug discovery. *J Recept Signal Transduct Res*, 2009, 29(3-4):127.
- 12 <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000196639-HRH1/cell/A-431>.
- 13 Oliveira RB, Chagas-Paula DA, Secatto A, et al. Topical anti-inflammatory activity of yacon leaf extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2013, 23:497-505.

(上接第 438 页)

- 2 Cu'ellar MJ. Screening of antiinflammatory medicinal plants used in traditional medicine against skin diseases. *Phytother Res*, 1998, 12(1):18-23.
- 3 Zhang S, Shao SY, Song XY, et al. Protective effects of *Forsythia suspense* extract with antioxidant and anti-inflammatory properties in a model of rotenone induced neurotoxicity. *Neuro Toxicol*, 2016, 52:72-83.
- 4 Lee DG, Lee SM. Lignans from the flowers of *Osmanthus fragrans* var. *Aurantiacus* and their inhibition effect on NO production. *Arch Pharm Res*, 2011, 34:2029-2035.
- 5 Wang Y, Zhao HF, Lin CX, et al. Forsythiaside A exhibits anti-inflammatory effects in LPS-stimulated BV2 microglia cells through activation of Nrf2/HO-1 signaling pathway.

Neurochem Res, 2016, 41:659-665.

- 6 Wu Y(吴悦). The role of forsythaside on the cytokine and antionxidative function in thymus tissue of Chickens. Harbin: Northeast Agricultural University(东北农业大学), MSc. 2013.
- 7 Li YX(李芸霞), Jiang XH(蒋学华), Zhou J(周静). The absorption mechanism of phillyrin in digestive tract in rat. *West China J Pharm Sci*(华西药学杂志), 2005, 20:387-390.
- 8 Li YX, Ye LH, Jiang XH, et al. Assessment and modulation of phillyrin absorption by P-gp using Caco-2 cells and MDR1-MDCK II cells. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2011, 36(1):41-47.