



# 用于评价致敏原的 IgG-HepG2 细胞激活过程中相关炎症因子表达的观察

卢希<sup>1</sup>, 王明玮<sup>2</sup>, 雷帆<sup>1\*</sup>, 王玉刚<sup>1</sup>, 袁志漪<sup>1</sup>, 赵爽<sup>1</sup>, 李慧玉<sup>1</sup>,  
邢东明<sup>1</sup>, 杜力军<sup>1</sup>

(1. 清华大学医学院生命科学学院 教育部蛋白质重点实验室, 北京 100084;  
2. 新疆军区西安第二干休所 医务室, 陕西 西安 710100)

**[摘要]** 目的:研究转 IgG 启动子调控 GFP 基因表达 HepG2 细胞激活过程中相关炎症因子表达的变化。方法:采用 Elisa 法评价葛根素和 LPS 后诱导 IgG 启动子转基因细胞分泌 IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  和 MCP-1 蛋白量, qPCR 法评价炎症相关因子和固有免疫相关因子的 mRNA 转录表达量。结果:和 HepG2 细胞相比, IgG 启动子转基因细胞不增加炎症因子分泌和基因表达量, 不激活固有免疫。葛根素不增加转基因细胞炎症因子分泌和基因表达量, 不激活固有免疫系统。LPS 激活固有免疫系统, 显著升高 IL-8, TNF- $\alpha$  和 MCP-1 分泌量。结论: IgG 启动子转基因 HepG2 细胞可以作为评价 II 型变态反应的特异性细胞模型, 提示葛根素可以作为特异性激活 IgG 启动子的阳性对照品。

**[关键词]** IgG 启动子; 致敏原; 炎症因子

中药注射剂是我国独创的一种中药新剂型, 其既保留了中药特色, 又具有起效快作用强的特点, 在多种危重疾病的治疗上占有优势, 不少中药注射剂在临床使用上占据相当大的比例。但是近年来中药注射剂的过敏反应报道越来越多, 尤其是严重的过敏性休克, 使其安全性受到质疑, 严重限制了其应用。为找到中药注射剂致敏性的根源并且形成安全有效快速的检测技术, 我国科技工作者进行了多方位的尝试。为建立快速的筛选过敏原实验技术, 作者尝试将 IgG 启动子通过脂质体转染入 HepG2 细胞, 以绿色荧光蛋白表达作为报告系统, 建立一种致敏原快速筛选模型: IgG 启动子-HepG2 细胞模型<sup>[1-2]</sup>, 并利用该模型对已知致敏原和中药注射剂进行了筛选, 证明其对 II 型过敏反应具有高敏感性和特异性。为了深入研究该转基因细胞模型的特异性和致敏原对其致敏的可能机制, 对 IgG 启动子表达后相关炎症因子表达和释放进行了研究。

## 1 材料

IgG 质粒<sup>[1]</sup>由本室王玉刚博士提供; HepG2 细胞购自中国医学科学院细胞中心; 葛根素 (Pur) 对照品购自中国药品生物制品检定所; G418 和 LPS 均购自 Sigma 公司; Lipofect 转染试剂和 QPCR 试剂盒购自北京天根生化试剂公司; IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  和单核细胞趋化因子-1 (MCP-1) ELISA 试剂盒均购自 R&D; MMLV 逆转录酶系统购自全式金生化试剂公司; 其余试剂均为国产分析纯。酶标仪 (BIORAD), LC-480 型 QPCR 仪 (ROCHE), 细胞培养箱 (SANYO)。

## 2 方法

**2.1 转染细胞建立** 将培养的 HepG2 细胞按照  $2 \times 10^5$  个/mL 接种 6 孔板, 每孔 1 mL 细胞悬液。细胞接种 12 ~ 16 h 后进行转染。按照 Lipofect 转染试剂说明书进行操作, 准备 A 溶液 (质粒 + 无血清 1640 溶液) 和 B 溶液 (脂质体 + 无血清 1640 溶液), 将 2 液混合后室温放置 20 min。500  $\mu$ L/孔均匀滴加在细胞表面, 稍晃动后, 再加入 300  $\mu$ L 无血清的 1640 溶液。阴性对照孔加入空质粒, 操作如前。37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养 24 h。转染细胞用 G418 (终浓度 400 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 筛选 8 d, 每日换液, 直到阴性对照孔细胞全部死亡为止。换 80 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> G418 继续培养, 维持稳定转染克隆, 用于后续的试验。

**[稿件编号]** 20110612005

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目 (30801523, 30973896, 81073092); 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09308-003, 2009ZX09502-021, 2009ZX09502, 2011ZX09101-002-11)

**[通信作者]** \*雷帆, Tel/Fax: (010) 62796270, E-mail: leifan@tsinghua.edu.cn



**2.2 药物处理和样品收集** G418 筛选出阳性克隆后,传代培养,获得大量阳性克隆细胞。按照  $2 \times 10^5$  个/mL,接种 6 孔板,每孔 1 mL 细胞悬液。接种后第 2 天可以加入 LPS  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,葛根素  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,样品每个浓度平行 3 个孔。同时将没有转染的 HepG2 细胞按照转染阳性细胞操作和加药作为对照。加药后 24 h 收取上清液后立即进行炎症相关因子 IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  和 MCP-1 浓度测量。细胞用 PBS 洗 2 次后,用 Trizol 法提取总 RNA,逆转录成 cDNA 后用荧光定量 PCR (QPCR) 检测相关因子

mRNA 含量。

**2.3 炎症因子检测** 每份细胞培养液样品取 200  $\mu\text{L}$ ,按照 Elisa 试剂盒说明书操作,同时进行标准曲线测定。标准曲线根据预试验结果进行浓度范围的调整。

细胞用 Trizol 提取总 RNA,用 MMLV 逆转录酶将其逆转录成 cDNA,以不同引物进行 QPCR,检测样品中 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, MCP-1, TLR2, TLR4, MYD88, NOD2 基因 mRNA 表达情况,以 Actin 为对照,引物序列见表 1。

表 1 各因子 QPCR 引物序列

名称	上游引物	下游引物
Actin	5'-CACGATGGAGGGCCGGACT-3'	5'-TAAAGACCTCTATGCCAACA-3'
TNF- $\alpha$	5'-CAAGCCTGTAGCCCATGTTG-3'	5'-CCTGGGAGTAGATGAGGTAC-3'
IL-8	5'-CAGTTTTGCCAAGGAGTGCTAA-3'	5'-AACTTCTCCACAACCCTCTGC-3'
MCP-1	5'-TCAGCCAGATGCAGTTAACGC-3'	5'-TGATCCTCTTGTAGCTCTCCAGC-3'
TLR2	5'-CTCCAGGAGCTGGAGAACT-3'	5'-GGAACCTAGGACTTTATCGCA-3'
TLR4	5'-GCTGGAAGTTGAACGAATGG-3'	5'-CTGTCCTCCACTCCAGGTA-3'
MYD88	5'-CAGGATGCAAGATATATTCAGG-3'	5'-ATTTTAAAGCCATCTCAAGAGGC-3'
NOD2	5'-GAAGTACATCCGCACCGAG-3'	5'-GACACCATCCATGAGAAGACAG-3'
IL-1 $\beta$	5'-ATGGCAACTGTTCTGAACTCAACT-3'	5'-CAGGACAGGTATAGATTCTTCTTT-3'

**2.4 数据获取与处理** 所得 QPCR 数据以 Roche 480 分析软件进行处理,所有数据以 SPSS 13.0 软件进行统计学检验,以  $P < 0.05$  为有显著性意义。

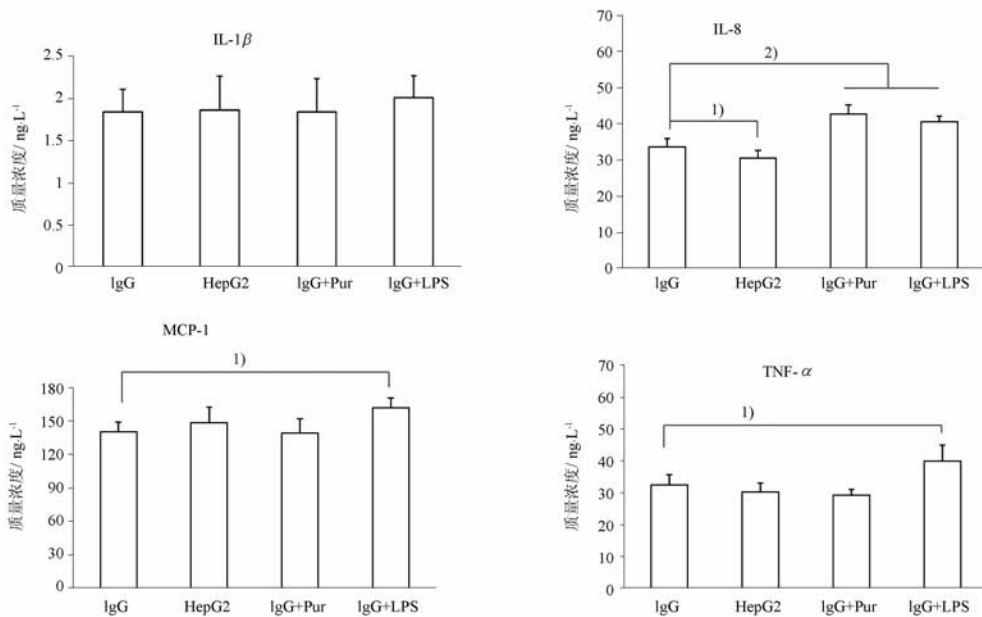
### 3 结果

**3.1 葛根素和 LPS 对细胞分泌炎症相关因子的影响** 根据 ELISA 说明书和预试验中培养基内各分泌因子浓度,进行因子的标准曲线计算, TNF- $\alpha$  线性方程为  $Y = 205.11X + 5.7601$ ,  $r = 0.9906$ , 测试浓度  $7.81 \sim 1000 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ; MCP-1 线性方程  $Y = 458.46X - 65.321$ ,  $r = 0.9801$ , 测试浓度  $7.81 \sim 1000 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ; IL-8 线性方程  $Y = 110.66X - 5.7078$ ,  $r = 0.9841$ , 测试浓度  $3.9 \sim 500 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ; IL-1 $\beta$  线性方程  $Y = 55.199X - 0.4062$ ,  $r = 0.987$ , 测试浓度  $0 \sim 15.6 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将各样品酶标仪测得数据,根据标准曲线换算成浓度,计算培养液中各细胞因子浓度,见图 1。HepG2 细胞转染 IgG-GFP 质粒后,可以显著增加 IL-8 分泌量,不增加 IL-1 $\beta$ , MCP-1, TNF- $\alpha$  的分泌量。葛根素可以显著增加 IL-8 分泌;其他因子作用不明显。LPS 显著增加炎症相关因子 TNF- $\alpha$ , IL8, MCP-1 分泌,对 IL-1 $\beta$  有增加

趋势,但作用不明显。

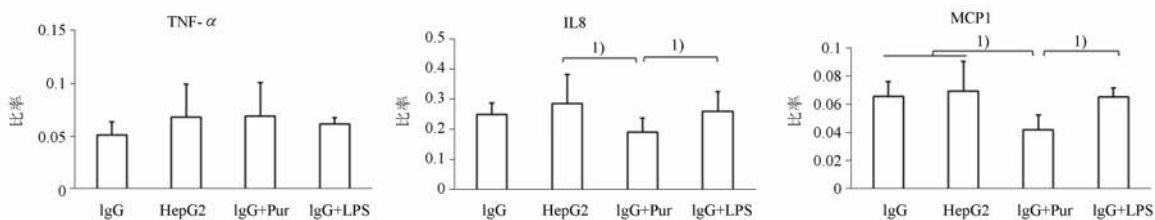
**3.2 细胞炎症因子 mRNA 表达的变化** 转染入 IgG 启动子质粒或者加入葛根素、LPS 后可以改变 HepG2 中一些炎症相关因子如 IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  的分泌量,进行 mRNA 检测,以证实其含量升高的形成机制是否和 mRNA 转录增加有关,见图 2。可以看到, IgG-启动子质粒转染后,对 IL-8, TNF- $\alpha$  和 MCP-1 的 mRNA 表达均未见明显上调。葛根素可以显著降低细胞 IL-8, MCP-1 mRNA 表达量。LPS 对 IL-8, TNF- $\alpha$ , MCP-1 的 mRNA 表达量没有显著影响。

**3.3 对模式识别受体表达的影响** 为了进一步研究药物加入细胞后引起的炎症相关因子分泌量改变是否由细胞固有免疫系统介导的,对介导固有免疫的模式识别受体 TLR2, TLR4 和其下游的接头蛋白 MyD88, NOD2 mRNA 表达量进行研究。由图 3 可见,转染 IgG 后对于模式识别受体 TLR2, 4 和 NOD2 等均无明显影响。LPS 则对 TLR4 及其下游接头蛋白 MyD88 有促进表达的作用。葛根素对此无明显影响。



与 IgG 转基因对照组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

图 1 ELISA 测定加药后细胞培养基中各类炎症因子量的变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



与对照组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$  (图 3 同)。

图 2 葛根素和 LPS 对相关炎症因子的表达影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

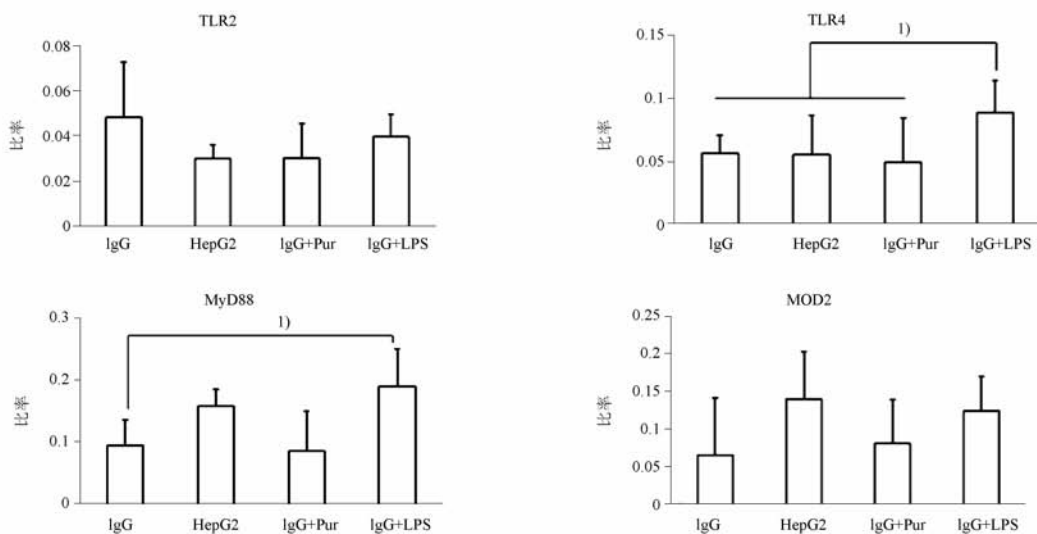


图 3 各种因素对相关细胞模式识别受体的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



#### 4 讨论

由于在过敏原介导的变态反应中常伴有免疫炎症因子的产生和释放,因此考察了 IgG-启动子质粒转染 HepG2 细胞对模式识别受体及其下游炎症因子的影响。以全面认识该细胞模型。作者选择了模式识别受体 TLR2/4 以及下游接头蛋白 MyD88, NOD2, 炎症因子 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  和 IL-8, 以及趋化因子 MCP-1 等进行了考察。以 Elisa 定量检测分泌型炎症因子,以 qPCR 定量检测其 mRNA 表达。前期实验<sup>[2]</sup>表明葛根素在质量浓度为 0.1 ~ 1 mg · L<sup>-1</sup> 时和 LPS 在质量浓度为 2.5 ~ 20 mg · L<sup>-1</sup> 可以显著增加 IgG-HepG2 细胞的荧光表达量,所以本实验选择了在葛根素和 LPS 可以激活 IgG 启动子表达的 1 个浓度进行试验。

结果表明 IgG-启动子质粒转染 HepG2 细胞后,对于 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-8 mRNA 无明显影响,进一步研究发现其对于细胞的固有免疫系统模式识别受体 TLR2, TLR4 及其接头蛋白 MyD88 和 NOD2 激活没有明显影响,对下游炎症因子的表达没有明显影响,提示 IgG 启动子转染该细胞对于固有免疫系统及其相关炎症因子无明显影响。表明该细胞模型对于评价 IgG 激活表达具有相对特异性。但其所表现出的使 IL-8 分泌增加的机制及其意义尚有待于进一步考察。实验显示 IgG 启动子转染细胞的 IL-8 mRNA 表达和未转染细胞无显著性差异,提示其分泌性蛋白的升高非转录表达水平,可能在于其后的其他途径。总之, IgG 启动子调控 GFP 表达质粒转染 HepG2 细胞后不会造成炎症因子的表达和释放,不改变细胞的免疫功能,因此其检测 IgG 启动子激活具有特异性,加药后 GFP 表达仅是由于 IgG 启动子激活导致的,与细胞固有免疫系统和相关炎症因子释放无关。

作者以往的工作反复重复了葛根素(Pur)能够激活 IgG 启动子,并使其表达上调。本实验中观察

到葛根素对于相关炎症因子却有一定的下调作用,这一结果和许多文献报道葛根素可以抑制炎症因子(IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  等)表达相一致<sup>[3-4]</sup>。表明了葛根素对于 IgG 激活表达的相对特异性,与炎症反应无关。有报道通过检索 1994 年至 2008 年国内公开发行的医学期刊报道应用葛根素注射剂致不良反应案例,分析发现葛根素注射剂不良反应以溶血反应居多<sup>[5]</sup>,溶血反应为 II 型过敏反应中常见表现,所以也反映了葛根素 IgG 激活表达的对照品是合适的。

本试验证明了 IgG 启动子转染 HepG2 细胞模型对于评价 IgG 激活表达具有特异性, IgG 启动子转染 HepG2 细胞后不影响模式识别受体活化,不介异其后续的炎症因子表达。该细胞模型用于筛选激活 IgG 启动子的刺激物具有较好的专属性。葛根素不上调炎症因子表达,不激活固有免疫系统,其对 IgG 启动子表达的激活与炎症反应无关,具有相对特异性,可以考虑作为 IgG 激活表达的对照品。后续还需进行深入研究,以确证葛根素对 IgG 启动子的特异性激活作用。

#### [参考文献]

- [1] 王玉刚,李乐乐,雷帆,等. IgG 启动子探针针对中药注射剂进行临床前安全性评价的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(1): 76.
- [2] 袁志漪,王玉刚,雷帆,等. IgG-HepG2 细胞评价复方苦参注射液及其生产过程可能产生致敏原的研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(14): 1850.
- [3] Chang Y, Hsieh C Y, Peng Z A, et al. Neuroprotective mechanisms of puerarin in middle cerebral artery occlusion-induced brain infarction in rats[J]. J Biomed Sci, 2009, 16(1): 9.
- [4] Wan H, Zhu H, Tian M, et al. Protective effect of chuanxiong-zinc-puerarin in a rat model of transient middle cerebral artery occlusion-induced focal cerebral ischemia[J]. Nucl Med Commun, 2008, 29(12): 1113.
- [5] 王德才,吴从平. 葛根素注射剂致溶血反应 44 例分析[J]. 中国药房, 2009, 20(12): 943.

## Investigation of inflammasome during excitation of IgG-HepG2 cells for evaluation of allergenic ingredients

LU Xi<sup>1</sup>, WANG Mingwei<sup>2</sup>, LEI Fan<sup>1\*</sup>, WANG Yugang<sup>1</sup>,  
YUAN Zhiyi<sup>1</sup>, ZHAO Shuang<sup>1</sup>, LI Huiyu<sup>1</sup>, XING Dongming<sup>1</sup>, DU Lijun<sup>1</sup>

- (1. *Protein Science Laboratory of the Ministry of Education, Laboratory of Pharmaceutical Sciences, School of Life Sciences and School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China;*  
2. *Medical Service, Xi'an the Second Sanatorium, Xinjiang Province, Xi'an 710100, China*)

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the alteration of inflammasome and receptor during IgG promoter transfected to HepG2 cells. **Method:** By assay of Elisa to evaluate the secretion of IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  and MCP-1 after puerarine and LPS administration, and by assay of real time PCR to evaluate the expression of mRNA of IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  and MCP-1, as well as the receptors of TLR2,4 and NOD2, MyD88. **Result:** IgG promoter did not active innate immunity and enhance the expression and secretion of inflammasome in HepG2. Puerarine did not active the inflammasome either. LPS activated the innate immunity and increased the secretion of IL-8, TNF- $\alpha$  and MCP-1. **Conclusion:** IgG-HepG2 cells could be used specifically as the model of allergy type II for ingredients screening. It is suggested that puerarine was suite for the activator for this type of allergy as positive control.

[**Key words**] IgG promoter; allergenic ingredients; inflammasome

doi:10.4268/cjcm20111404

[责任编辑 张宁宁]

### 书 讯

由高文远教授编写的《现代中药质量控制及技术》已在科学出版社出版发行,该书从中药质量控制的重要性和必要性出发,叙述了中药质量控制的发展历史、发展趋势;详细介绍了中药的来源鉴别、性状鉴别、显微鉴别、理化鉴别和新技术在中药鉴别中的应用;高效液相色谱、超高压液相色谱、高效毛细管电泳、色谱-质谱联用技术等色谱技术在中药质量控制中的应用;还包括中药指纹图谱质量控制技术及生物效价、代谢组学、分子生物学等现代质量控制技术。此外,还专辟章节介绍了含不同类型活性成分中药及不同剂型中药、中药材、中药饮片和中成药,以及中药保健食品的质量控制。既可以供中药和药学相关领域的科研、教学人员使用,也可以作为中药和药学相关领域的研究生、本科生参考。

当当网、卓越网、新华书店及医学专业书店有销售。定价120元。免邮寄挂号费用,联系人:温晓萍;电话:010-64034601 64015165;地址:北京市东黄城根北街16号科学出版社(100717);联系人:温晓萍;请在汇款附言注明购书的书名、册数、联系电话、发票等。