



IgG 启动子探针对中药注射剂进行临床 前安全性评价的研究

王玉刚¹, 李乐乐¹, 雷帆¹, 梁爱华², 邢东明¹, 杜力军^{1*}

(1. 清华大学 生物科学与技术系, 医学院 药学系 药物药理研究室, 北京 100084;

2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:利用分子生物技术构建免疫球蛋白 G(IgG)启动子调控绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)转基因细胞,尝试以 IgG 基因表达起始为标准在临床前对中药注射剂进行其诱导 II 型变态反应的可能性预测。方法:构建 IgG 启动子调控绿色荧光蛋白表达的转基因细胞系,用葛根素, KCl, 聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯(吐温 80)对该系统进行测试,并尝试用该系统对不同批次鱼腥草注射液进行筛选评价,观察统计各给药组中发光细胞数量的变化。结果:非离子表面活性剂吐温 80 对 IgG 表达启动过程有抑制作用,葛根素能显著激活 IgG 基因的表达, KCl 对 IgG 表达无作用。所测批次鱼腥草注射液对 IgG 表达没有激活作用。结论:IgG 启动子调控绿色荧光蛋白表达细胞模型能在 IgG 表达层次评价药物致敏性,吐温 80 能在转录水平上抑制 IgG 的表达,所测批次鱼腥草注射液在 IgG 转录层次上无诱导 II 型变态反应活性。

[关键词] IgG; II 型变态反应; 鱼腥草注射液; 葛根素; 转录调控

中药注射剂是在中医药制剂基础上发展起来的新剂型,其保留了传统中医药特色,又具有西药注射剂起效快,作用强等特点,尤其在危重疾病急救及感染性疾病、心脑血管疾病、恶性肿瘤等疾病的治疗上具有一定的优势。然而由于我国中药注射剂安全性评价研究的相对滞后,中药注射剂临床不良反应时有报道,找出致敏原,改进致敏试验方法、提高准确率和保证临床合理用药是中药注射剂安全性研究的关键所在^[1]。中药注射剂不良反应以变态反应为主,占不良反应病例的 69.9%^[2]。II 型变态反应是注射剂主要不良反应之一,该类变态反应以免疫细胞识别药物成分并表达分泌相应 IgG 为主要特征^[3-4]。

鱼腥草是临床上广泛用于治疗感染类疾病的药物。据国家药品不良反应监测中心病例报告统计,使用含鱼腥草或鱼腥草素钠的 7 个注射剂引起过敏性休克、全身过敏反应、胸闷、心悸、呼吸困难和重症药疹等严重不良反应,已明确提示该类药品存在临床用药安全隐患^[5]。据调研,鱼腥草注射液不良反应以变

态反应为主,其中以过敏性休克最为严重,是引起死亡的主要原因^[6]。2006 年 6 月 1 日,国家 SFDA 发布了停止鱼腥草注射液临床使用的报告。本研究基于药物导致 II 型变态反应中药物特异性 IgG 被激活表达的原理,构建 IgG 启动子调控绿色荧光蛋白转基因细胞系,尝试筛查以激活 IgG 表达为致敏机制的注射剂,并对鱼腥草注射进行相关实验观察。

1 材料与方法

1.1 药物 鱼腥草注射液(正大青春宝药业有限公司,批号分别为 0809091, 0809092, 0809093, 0809094)。给药时用细胞生长培养基配成原液、稀释 10 倍、稀释 100 倍等 3 个剂量组。聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯(吐温 80), KCl 和葛根素用细胞生长培养基配至所需浓度。吐温 80(北京化学试剂公司,批号 940504); KCl(北京北化精细化学品有限责任公司,批号 20000320);葛根素(中国药品生物制品检定所,批号 725-200108)。

1.2 仪器 Olympus SERIES 120 荧光倒置显微镜; DYY-7C 型电泳仪(北京六一仪器厂); BIOER Little Genius PCR 仪; SANYO MCO-15AC CO₂ 细胞培养箱; 复日科技 FR-200A 型全自动紫外与可见分析装置。

1.3 人 IgG 启动子 DNA 片段获得 抽取健康男性成年人全血 5 mL,用基因组抽提试剂盒(Tiagen)

[收稿日期] 2009-09-02

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30801523); 国家“十一五”科技支撑计划(2006BAI08B03-09); 中国博士后科学基金(20080440418); “重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09103-301, 2009ZX09502-021)

[通信作者] * 杜力军, E-mail: lijundu@mail.tsinghua.edu.cn



按照说明书操作步骤提取人基因组 DNA。以人基因组 DNA 为模板,用 primer premier 5.0 设计引物扩增 IgG 的启动子序列为 sense: 5'-GGTTGATGTAG-GACGCCAAATGCT-3', antisense: 5'- TGA CTGC-CCTGGTCA GCCAGAAT-3'。

1.4 IgG promoter-GFP 表达重组质粒的构建 将 IgG promoter 的 PCR 产物电泳分离纯化后用 T4 连接酶 (Fermentas) 连接到过渡载体 pUCm-T 载体上,用 EcoRI (Fermentas) 酶切法挑选正确连接的克隆并测序。将正确连接且测序无误的质粒用 KpnI (Fermentas) 37 °C 酶切 2 h,将 pEGFP-N1 质粒用 AseI (Fermentas) 37 °C 酶切 2 h 后分别用 Klenow fragment (Fermentas) 37 °C 补平 10 min,将产物用酚氯仿 (Sangon) 抽提后用 XhoI 37 °C 酶切 2 h。将 pEGFP-N1 双酶切的产物用 BAPF (Worthington) 55 °C 去磷酸化。将 IgG promoter-pUCm-T 质粒和 pEGFP-N1 质粒双酶切的产物用 T4 连接酶连接。将连接子转化入 DH5 α 感受态细胞中,挑取单克隆并 SacI (Fermentas) 酶切鉴定选择含正确连接质粒的菌种并大量提取高纯度质粒。

1.5 细胞转染与细胞培养 用含 20% 胎牛血清 (Gibico) DMEM 细胞培养基 (Gibico) 培养的 RPMI-8226 细胞 (中国医学科学院细胞中心) 用阳离子脂质体 (Tiangen) 按照说明书在培养瓶内将构建好的 IgG promoter-GFP 转染入 RPMI-8226 细胞。转染 72 h 后将细胞接种于 96 孔板进行试验。

1.6 给药及荧光拍照 用移液器将转基因细胞在培养瓶中吹打混匀,按照 6×10^5 个/mL 的细胞密度在 96 孔板内每孔接种 100 μ L 细胞悬液。在细胞培养箱培养 1 h 后给药。各药用含 20% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养基配制。每种药液按 10 倍浓度等比稀释成浓度梯度,各药物各浓度做 4 复孔。对照组给含 20% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养基。给药 30 min 后在荧光显微镜下用 20 倍物镜,10 倍目镜随即选取视野拍照,曝光时间固定为 400 ms。在每个孔内取 5 个无相互重叠的拍照视野拍照。

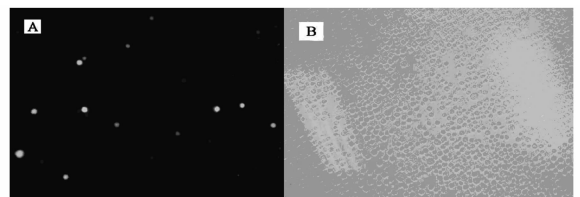
1.7 数据处理 用 Image J 软件扫描每张图片中可见点的荧光密度,以扫描值 ≥ 2.000 的荧光点定义为一个荧光细胞,计数每一张图片中荧光细胞。用 SPSS11.0 软件做各数据处理,单因素方差分析, *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 人 IgG promoter 片段的 PCR 扩增及 TA 克隆与分析 以人基因组 DNA 为模板,用引物 sense 和 antisense 在 60 °C 退火条件下进行 35 个 PCR 反应循环,将 PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳检测,只得到一条 284 bp 大小的特异条带,与目的条带大小吻合。将用 EcoRI 酶切鉴定选择的正向连接 TA 克隆菌液递交给上海生工生物技术有限公司测序,测序结果与目的序列通过 BLAST 程序进行比对,相似度为 100%。

2.2 人 IgG promoter-GFP 表达质粒的鉴定 用 EcoRI 酶切鉴定选择转入正确连接的 IgG promoter -GFP 表达质粒的克隆,大量摇菌并提取质粒。以该质粒为模板,用 sense 和 antisense,60 °C 退火条件下进行 PCR 反应,能扩增出清晰的 284 bp 大小的目的条带。

2.3 RPMI-8226 转基因细胞的表达及鉴定 用阳离子脂质体将 IgG promoter -GFP 转染入 RPMI-8226 细胞 36 h 后用荧光显微镜观察,有大量细胞开始表达绿色荧光蛋白 (图 1)。将该细胞悬液作模板,用 sense 和 antisense 在 60 °C 退火条件下进行 PCR 反应,得到 284 bp 大小的特异条带。



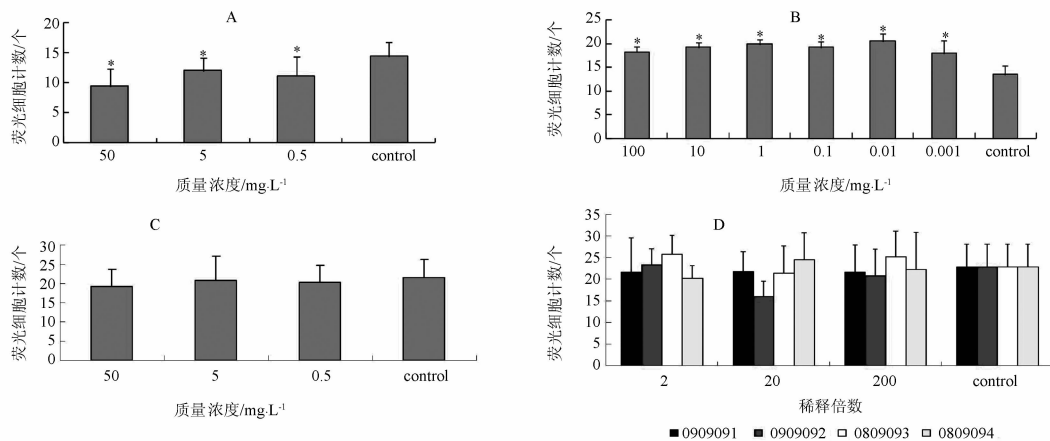
A. 激发光下转基因细胞;绿色荧光圆点 (荧光强度 ≥ 2.000),为 IgG promoter-GFP 转基因 RPMI-8226 细胞;B. 可见光下同一视野中 RPMI-8226 细胞。

图 1 IgG promoter-GFP 转基因 RPMI-8226 细胞

2.4 药物对 IgG 基因表达启动的影响 给药 30 min 后对细胞绿色荧光细胞进行计数。结果表明,在给药 30 min 后吐温 80 对 IgG 启动子有抑制作用,葛根素对 IgG 启动子有显著激活的作用。KCl 及测试的 4 个批号鱼腥草注射液对 IgG 启动子无激活作用 (图 2)。

3 讨论

目前已有研究证明药物特异性 IgG 被激活表达与注射剂致敏具有相关性^[7]。本研究成功地构建了 IgG 启动子调控绿色荧光蛋白表达的转基因细胞模型。在该模型中质粒 pEGFP-N1 调控绿色荧光蛋白表达的 CMV 启动子被 IgG 启动子替代,因此给药



A. 吐温 80; B. 葛根素; C. KCl; D. 不同批次鱼腥草注射液; 与对照组相比 * $P < 0.05$ ($\bar{x} \pm s, n = 4$)。

图 2 不同受试药物对 IgG 启动子的调控活性

后绿色荧光蛋白表达量的变化直接反映并模拟了细胞受到药物刺激后 IgG 基因表达的调控。

在实验拍摄中随机选取视野,曝光时间均为 400 ms,发光较弱的细胞在该曝光时间内不被感应。以荧光细胞计数为指标进行 IgG 启动子调控 GFP 表达差异的考察较以一定范围内总的荧光强度为指标而言,可以排除由于培养板各孔差异而带来的荧光背景不一致以及 96 孔板无法使细胞铺板时达到较理想的均一度等问题。为了保证荧光细胞计数的客观性,实验中设定一固定的荧光强度 (≥ 2.000) 为判断一个荧光细胞计数点的标准。由于 RPMI-8226 细胞系对生长条件要求苛刻,且考虑到排除无血清或低血清培养对细胞状态以及对 IgG 启动子针对药物反应敏感性可能造成的未知影响,本实验用 RPMI-8226 细胞系正常生长培养基配制含药培养基进行给药试验。

有分析指出葛根素临床不良反应以 II 型变态反应引起溶血性贫血为主^[8]。为了检验该系统响应的特异性,分别用 KCl、葛根素对该系统进行测试。结果显示 KCl 对 IgG 启动子活性无作用, $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葛根素能激活 IgG 表达。提示葛根素的过敏反应与 IgG 表达升高有关,同时也表明本系统对 II 型变态反应致敏原有一定的特异性。

本研究尝试对鱼腥草注射液及其已报道的致敏成分吐温 80 进行筛选评价^[9]。在本实验条件下所检测的 4 个批次鱼腥草注射液均未出现对 IgG 启动表达的激活作用,作为该注射剂的助溶剂吐温 80 ($500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 对 IgG 表达则显示一定的抑制作用。

提示临床报道的鱼腥草注射液致敏反应可能与 II 型变态反应无关。有报道鱼腥草注射液致敏反应可能与其辅料吐温 80 的类过敏反应有关^[9],本研究从一个侧面支持这一假设。

作者曾就利用基因启动子作为分子靶点构建高通量平台筛选并对中药复方吴茱萸汤的药效靶点 TPH2 启动子的工作进行了报道^[10]。本研究依据 IgG 高表达与 II 型变态反应的相关性构建了 IgG promoter-GFP 转染 RPMI-8226 细胞模型。RPMI-8226 细胞来自人多发性骨髓瘤,为浆细胞瘤细胞系,该细胞系具有抗体分泌功能,用它作为 IgG 载体模型能较好地模拟 II 型变态反应中 IgG 被激活表达。本研究基于 IgG 激活表达与要无诱导 II 型变态反应之间的相关性,利用该细胞模型为体外高通量筛选药物 II 型变态反应致敏原及评价药物致敏风险技术平台的可行性建立进行了有价值的探索,但该模型对药物筛选的适用性尚需更多的数据积累。

[参考文献]

- [1] 李连达,李贻奎,张金艳. 中药注射剂安全性研究的关键问题[J]. 河南中医,2008, 28(1):1.
- [2] 梁进权,邹元平,邓响潮. 中药注射剂不良反应的文献调查与分析[J]. 中国医院药学杂志,2003, 23(8):486.
- [3] Rebecca Gruchalla. Understanding drug allergies[J]. J Allergy Clin Immunol, 2000, 105(6):S637.
- [4] Anna Zawodniak, Werner J Pichler. Immunological principles of drug hypersensitivity[M]//Allergy Frontiers: clinical manifestations. Tokyo: Springer Japan, 2009:393.
- [5] 高蕊,翁维良,唐旭东. 鱼腥草注射液的不良反应及对策探讨[J]. 中药新药与临床药理,2006, 17(5): 383.
- [6] 李海涛,陈莲珍,林晓兰. 鱼腥草注射液的治疗作用与不良



- 反应[J]. 医药报道, 2006, 25(3):267.
- [7] Qiao Hailing, Gao Na, Jia Linjing, et al. Specific IgG antibodies in sera in patients with penicillin allergy[J]. Clin Experim Med, 2009, 9:105.
- [8] 邓培媛, 李群娜, 朱玉珍, 等. 葛根素注射剂不良反应及其影响因素分析[J]. 药物流行病学杂志, 2005, 14(1):14.
- [9] 张嘉, 李连达, 李贻奎, 等. 鱼腥草蒸馏液与两种增溶剂配伍后的致敏性比较[J]. 毒理学杂志, 2009, 23(1):47.
- [10] 王玉刚, 雷帆, 王秀坤, 等. 吴茱萸汤及其各组分对 TPH2 启动子活性影响的研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(17):2261.

Study on IgG promoter as probe to evaluate safety of injections in pre-clinic

WANG Yugang¹, LI Lele¹, LEI Fan¹, LIANG Aihua², XING Dongming¹, DU Lijun^{1*}

(1. Laboratory of Pharmaceutical Science, Department of Biological Sciences and Biotechnology, Department of Pharmacology and Pharmaceutical Science, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

2. Institute of Chinese Material Medica, Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[**Abstract**] **Objective:** To construct an effective system screening and evaluating possible injections and components inducing allergy type II. **Method:** Transfect IgG promoter-regulated green fluorescent protein expressing plasmid into RPMI-8226 cell. The number of fluorescent cells after drug treatment was calculated and statistically evaluated. **Result:** Tween 80 can suppress the expression of IgG effectively, and puerarin has activity of stimulating IgG expression, and the system has no response to KCl-treatment. No effect of Yuxingcao (Herba Houத்துyniae) injection on this system is observed. **Conclusion:** IgG promoter-drove green fluorescent protein expressing cell line can be used as system screening injections and components inducing allergy type II based on stimulating IgG promoter activity. Tween 80 can suppress the expression of IgG at the transcriptional level. Four batches of Yuxingcao injection cannot induce allergy type II by activating IgG expression.

[**Key words**] IgG; allergy type II; Herba Houத்துyniae; puerarin; transcriptional regulation

doi: 10.4268/cjcm20100116

[责任编辑 张宁宁]