

• 论著 •

脂多糖与高迁移率族蛋白 B1 联用对 HepG2 细胞释放细胞因子的影响

刘志锋 王娟 刘铮 唐柚青 孟繁魁 刘靖华 苏磊

【摘要】 目的 观察脂多糖(LPS)与高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)单用或联用对人肝癌细胞释放细胞因子的诱导作用。方法 培养人肝癌细胞株 HepG2,用原核重组表达载体 pET14b-HMGB1 原核表达纯化 HMGB1 蛋白;用不同浓度的 HMGB1 蛋白(0, 0.01, 0.1, 1, 10 mg/L)或不同浓度的 LPS(0, 0.1, 1, 10, 100 mg/L)以及 1 mg/L HMGB1 和 10 mg/L LPS 联用分别刺激培养的 HepG2, 24 h 后收集细胞上清液,用 LiquiChip 液相蛋白芯片系统检测上清液中粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、 γ -干扰素(IFN- γ)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)10 种细胞因子的表达水平。结果 LPS 可以剂量依赖性的方式刺激 HepG2 分泌 IL-6、IL-8 表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而对 GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-10、IL-12、TNF- α 等作用不明显;不同浓度的 HMGB1 刺激 HepG2 后发现,低浓度的 HMGB1 可明显上调 IL-6、IL-8 的表达(P 均 < 0.01),但随着浓度升高,这种诱导作用逐渐减弱,并逐渐恢复至对照水平,而对其他 8 种细胞因子也无明显诱导作用。HMGB1 和 LPS 联用时,高浓度的 HMGB1 可明显抑制 LPS 对 HepG2 分泌 IL-6、IL-8 的诱导作用(P 均 < 0.01)。结论 人肝癌细胞株 HepG2 对炎性刺激仅能产生很少种类的细胞因子,其中 LPS 作用可以上调 IL-6 和 IL-8 水平,而 HMGB1 则表现出量效的反作用,并且高浓度的 HMGB1 可明显抑制 LPS 对 HepG2 分泌细胞因子的诱导作用。

【关键词】 脂多糖; 高迁移率族蛋白 B1; HepG2 细胞; 细胞因子; 脓毒症

Combined effect of high mobile group box-1 protein and lipopolysaccharide on release of cytokines from human HepG2 cells LIU Zhi-feng*, WANG Juan, LIU Zheng, TANG You-qing, MENG Fan-su, LIU Jing-hua, SU Lei. * Department of Intensive Care Unit, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, Guangdong, China
Corresponding author: SU Lei, Email: slei_icu@163.com

【Abstract】 **Objective** To study the effects of high mobile group box-1 protein (HMGB1) and lipopolysaccharide (LPS) singly or in combination on release of cytokines from human liver carcinoma cell line (HepG2). **Methods** HepG2 cells were cultured, and purified HMGB1 protein was prepared by chromatography on Ni²⁺-NTA Sepharose column under natural conditions with recombinant expression plasmid pET14b-HMGB1. Different concentrations of HMGB1 (0, 0.01, 0.1, 1, 10 mg/L) and LPS (0, 0.1, 1, 10, 100 mg/L) were added into the cultured cells for 24 hours, respectively. Then the supernatant were collected to detect the levels of granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-1 β (IL-1 β), IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, and IL-12 by using LiquiChip system. Lastly, HepG2 cells were costimulated with 10 mg/L LPS and 1 mg/L HMGB1 for 24 hours. The supernatant were collected to determine the levels of above ten of cytokines. **Results** The expression and release of IL-6 and IL-8 increased from HepG2 cells after being stimulated by LPS in a dose-dependent manner, but there were no changes in other eight kinds of cytokines ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Low concentration of HMGB1 could up-regulate the expression of IL-6 and IL-8 in HepG2 cells (both $P < 0.01$). But the extent of induction decreased with higher concentration of HMGB1. Similar to LPS, there was no effect of HMGB1 on the expression of other eight kinds of cytokines from cultured HepG2 cells. Furthermore, high concentration of HMGB1 could obviously inhibit the upregulation of IL-6 and IL-8 by high concentration of LPS when the HepG2 cells were costimulated with LPS and HMGB1 (both $P < 0.01$). **Conclusion** HepG2 cells could only express and release a few kinds of cytokines when the cells were stimulated with pro-inflammatory agents, such as LPS or HMGB1. Two kinds of cytokines, IL-6 and IL-8 could be up-regulated by LPS and low concentration of HMGB1, and HMGB1 acted as an inhibitor of LPS to down-regulate the expression and release of IL-6 and IL-8 from HepG2 cells.

【Key words】 lipopolysaccharide; high mobile group box-1 protein; HepG2 cell; cytokine; sepsis

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.09.007

基金项目:中国博士后科学基金项目(20080431419)

作者单位:510010 广东,广州军区广州总医院 ICU(刘志锋、唐柚青、孟繁魁、苏磊);510515 广东广州,南方医科大学省部共建功能蛋白质组学重点实验室(王娟、刘铮、刘靖华)

通信作者:苏磊,Email:slei_icu@163.com

细菌内毒素脂多糖(LPS)可诱导单核/巨噬细胞、血管内皮细胞等免疫细胞和炎症相关细胞分泌大量细胞因子和炎症介质,参与并促使脓毒症的发生发展。高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)是广泛存在于真核细胞核中重要的非组蛋白之一,在基因表达调控中起重要作用。最近研究发现 HMGB1 具有多种核外的生物学功能,作为细胞因子广泛参与炎症反应和脓毒症的发展过程,是 LPS 致死效应的重要晚期炎症介质^[1-2]。但两者同时作用会对机体细胞产生什么效应目前尚不清楚。本研究中以 LPS 与 HMGB1 单用或联用对人肝癌细胞株 HepG2 释放细胞因子的影响展开研究,以期明确 HMGB1 在脓毒症中的作用机制以及实质脏器细胞在脓毒症中发挥作用的可能机制提供实验和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂: RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco BRL 公司, LPS (E. coli, O11: B4) 购自美国 Sigma 公司, 限制性核酸内切酶 (Kpn I、Not I) 购自日本 TOYOBO 公司, 异丙基硫代-β-D-半乳糖苷 (IPTG) 和亲和层析用基质 (Ni²⁺-NTA-agarose) 购自荷兰 Qiagen 公司, 细胞因子检测试剂盒购自德国 Qiagen 公司, 重组融合表达载体 pET14b-HMGB1 原核表达质粒由南方医科大学病理生理学教研室惠赠, 人肝癌细胞株 HepG2 由广州军区总医院医学实验科保存。

1.2 重组人 HMGB1 蛋白的表达纯化: 将重组的融合表达载体 pET14b-HMGB1 经 Kpn I 和 Not I 酶切鉴定无误后, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 挑取单菌落, 接种于 5 ml 牛肉膏蛋白胨培养基 (LB) 培养液中, 37 °C 振荡培养过夜, 按 1:100 稀释, 扩大培养至波长 600 nm 处的吸光度 (A) 值为 0.6~0.8 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 37 °C 继续振荡培养 3 h。依照 His 标签蛋白纯化试剂盒操作说明, 用 Ni²⁺-NTA-agarose 纯化。将纯化得到的 HMGB1 蛋白经透析和过滤除菌、Bradford 法进行蛋白定量后备用。

1.3 细胞复苏培养和实验分组: 人肝癌细胞株 HepG2 复苏后, 离心 10 min, 弃上清液, 用含体积分数 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液混匀细胞, 调整细胞浓度至 (100~150) × 10⁴ 个/cm², 接种入培养皿中, 在 37 °C、体积分数为 5% 的 CO₂ 条件下培养。

实验前 1 d, 按 1 × 10⁴ 个/孔的密度将 HepG2 铺于 96 孔板中。培养 24 h 后, 培养液更换为无血清

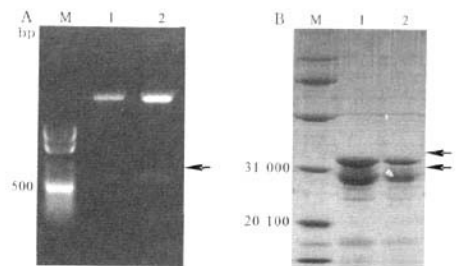
培养基, 培养 6 h 后用不同浓度的 HMGB1 蛋白 (0、0.01、0.1、1、10 mg/L) 和不同浓度的 LPS (0、0.1、1、10、100 mg/L) 分别刺激培养 HepG2; 用 1 mg/L HMGB1 和 10 mg/L LPS 联合作用刺激培养的 HepG2, 细胞刺激 24 h 后, 收集细胞上清液于 -80 °C 保存备检, 每种刺激做 3 个平行孔, 每个独立实验重复 3 次。

1.4 细胞培养上清液中细胞因子含量的检测: 粒-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、γ-干扰素 (IFN-γ)、白细胞介素-1β (IL-1β)、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 检测采用 LiquiChip 液相蛋白芯片系统完成。检测步骤按细胞因子检测试剂盒说明书进行, 最后在 LiquiChip 液相蛋白芯片检测系统上读取各组样品的平均荧光强度, 其对应的是样品的细胞因子浓度。

1.5 统计学处理: 用 SPSS 12.0 统计软件进行统计分析, 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HMGB1 蛋白的原核表达纯化: 经酶切后的 pET14b-HMGB1 在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 上可见 1 条约 660 bp 的条带, 与预期大小一致 (图 1A)。pET14b-HMGB1 质粒转化 DE3 后, 在凝胶电泳 27 000 和 31 000 处各见 1 条大量表达蛋白条带, 与预期大小相符 (图 1B)。纯化的蛋白经 Bradford 法蛋白定量为 430 mg/L。

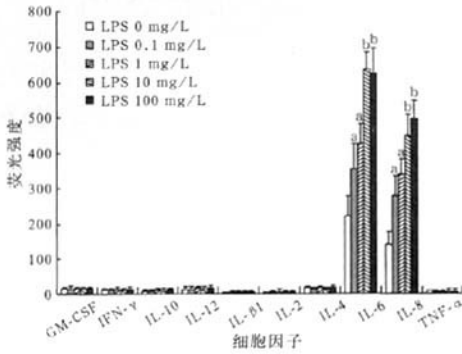


A, pET14b-HMGB1 的酶切鉴定, M: 100 bp DNA Marker, 1、2 分别为 pET14b-HMGB1 的 Kpn I 和 Not I 酶切鉴定, 箭头示 HMGB1 编码序列; B: 原核表达纯化 HMGB1 蛋白的 SDS-PAGE 鉴定, M: 蛋白 Marker, 1、2 分别为不同 pET14b-HMGB1 克隆表达纯化的 HMGB1 融合蛋白, 箭头示纯化的 HMGB1 蛋白

图 1 pET14b-HMGB1 载体的酶切鉴定及 HMGB1 蛋白的原核表达纯化

2.2 不同浓度 LPS 对 HepG2 释放细胞因子的影响 (图 2): LPS 0.1 mg/L 诱导 IL-6 和 IL-8 表达量

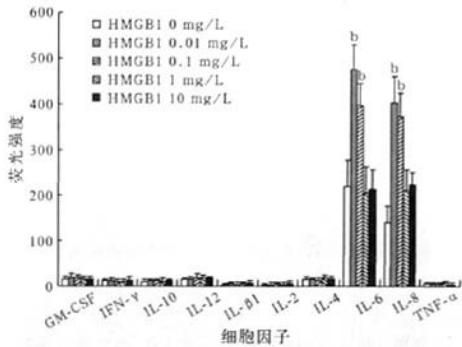
为对照的 1.61 和 1.98 倍(P 均 <0.05),并随 LPS 浓度增加而增加,至 10 mg/L 时为对照的 2.89 和 3.20 倍(P 均 <0.01),至 LPS 为 100 mg/L 时,二者表达量增加不明显。LPS 对其他 8 种细胞因子则无明显诱导作用。



注:与 LPS 0 mg/L 比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$

图 2 不同浓度 LPS 对人肝癌细胞株 HepG2 释放细胞因子的影响

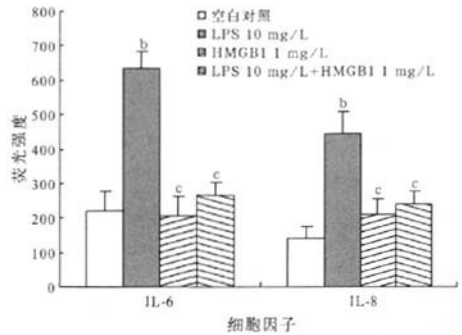
2.3 不同浓度 HMGB1 对 HepG2 释放细胞因子的影响(图 3);HMGB1 0.01 mg/L 诱导 IL-6 和 IL-8 表达量为对照的 2.15 和 2.88 倍(P 均 <0.01);但随 HMGB1 浓度的增加,诱导作用逐渐减弱,至 HMGB1 浓度 1 mg/L 和 10 mg/L 时 IL-6、IL-8 则均基本接近对照水平。HMGB1 对其他 8 种细胞因子也无明显诱导作用。



注:与 HMGB1 0 mg/L 比较,^b $P<0.01$

图 3 HMGB1 对人肝癌细胞株 HepG2 释放细胞因子的影响

2.4 LPS 和 HMGB1 联用对 HepG2 释放细胞因子的影响:10 mg/L LPS 与 1 mg/L HMGB1 联用可明显抑制 LPS 对 HepG2 分泌 IL-6、IL-8 的诱导作用(P 均 <0.01 ,图 4);而对其他 8 种细胞因子无明显诱导作用(结果未给出)。



注:与空白对照比较,^b $P<0.01$;与 LPS 10 mg/L 比较,^c $P<0.01$

图 4 LPS 与 HMGB1 联用对人肝癌细胞株 HepG2 释放细胞因子 IL-6 和 IL-8 的影响

3 讨论

脓毒症是由感染引起的严重全身炎症反应综合征,是危重患者的重要死因之一^[3]。已明确革兰阴性菌释放的 LPS 可激活或启动机体的免疫系统,包括中性粒细胞、内皮细胞、单核/巨噬细胞,并启动凝血、激肽和补体级联反应,细胞因子可触发失控的炎症级联反应,参与并促使脓毒症的发生发展^[4]。

HMGB1 是广泛存在于真核细胞核中最重要的非组蛋白之一,在基因表达调控中起重要作用。1999 年 Wang 等^[5]首次报道 HMGB1 参与脓毒症的发病过程。近年来发现,HMGB1 可分泌到细胞质或细胞外,诱导细胞分化,产生趋化作用,参与肿瘤细胞转移并作为重要的炎症因子在机体炎症反应中起重要作用^[1-2]。在炎症反应中,坏死组织细胞崩解以及 LPS、TNF-α、IL-1 等刺激活化单核/巨噬细胞都可促进 HMGB1 释放^[6];释放入血的 HMGB1 通过内分泌和旁分泌的形式作用于单核细胞、内皮细胞,引起一系列炎症因子释放、黏附分子表达及 HMGB1 进一步释放,导致炎症反应进一步扩大^[7]。本课题组前期关于 HMGB1 在细胞内定位及移位的研究中发现,用致炎因子 TNF-α 刺激细胞后 12 h 内未观察到 HMGB1 由胞核向胞质的移位现象,而随着刺激时间的延长,HMGB1 向胞质的移位开始明显增多^[8],虽然研究中没有直接观察到 HMGB1 由细胞内向外释放,但至少可以表明 HMGB1 作为一种特殊的炎症介质,主要在晚期炎症反应中发挥作用。

本研究中采用 LPS 与 HMGB1 单独和联合作用于人肝癌细胞株 HepG2,观察其对细胞因子释放的影响,结果发现,低浓度的 LPS 即可诱导 HepG2 表达 IL-6 和 IL-8,且随 LPS 浓度增加表达量进一步显著增加,存在剂量依赖效应,而 LPS 对其他

8 种细胞因子(GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-10、IL-12、TNF- α)则无明显诱导作用;同时还发现,低浓度的 HMGB1 即可明显诱导 IL-6 和 IL-8 表达,但随着 HMGB1 浓度的增加,这种诱导作用逐渐减弱,至 HMGB1 浓度 1 mg/L 和 10 mg/L 时 IL-6、IL-8 水平则均基本接近对照水平。

已有较多相关报道证实 HMGB1 可诱导多种细胞释放多种细胞因子,如刘靖华等^[9]研究结果发现, HMGB1 可诱导人脐静脉内皮细胞释放 IL-6、IL-8、GM-CSF、IFN- γ 、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)等多种炎症细胞因子,且 HMGB1 诱导 IL-6 的上调具有时效性和量效性,并可协同 LPS 刺激释放 IL-6。这与本研究结果有一致的地方,但也存在较大区别。本研究中发现 LPS 和低浓度的 HMGB1 均可诱导 IL-6 和 IL-8 表达上调,这是一致的;不同的是,作为炎症反应的重要效应细胞, HMGB1 可诱导人脐静脉内皮细胞释放多种细胞因子,而作为实质脏器的人肝癌细胞株 HepG2 则仅表现为 IL-6 和 IL-8 两种细胞因子表达上调。是否可以理解为,作为实质脏器的功能细胞,在脓毒症发生发展过程中更多的是充当被打击的角色,而在脓毒症炎症效应放大方面则作用较弱,一方面表现为产生的细胞因子种类少,而且 IL-6、IL-8 表达上调的量也较内皮细胞相对低;另一方面随着 HMGB1 浓度的增加,这种诱导作用逐渐减弱,并且高浓度的 HMGB1 可以充当 LPS 抑制剂的角色,明显抑制 LPS 对 HepG2 分泌 IL-6、IL-8 的诱导作用,这点好像与刘靖华等的研究结果相悖。但经过比较则发现,在刘靖华等的研究中, HMGB1 刺激的最大浓度只有 0.075 mg/L;而本研究中 HMGB1 浓度的跨度大。这究竟是所用细胞种类不同引起的,还是由于剂量原因出现的差异,都有待进一步深入研究。

此外,需要说明的是,在纯化 HMGB1 蛋白时分离胶上也得到了 2 个条带,分别为 27 000 和 31 000 大小,而通过计算得出的 HMGB1 蛋白相对分子质量为 27 000,通过分析鉴定认为可能是 HMGB1 在原核细胞内发生了某种修饰所致。类似情况出现在赵善超等^[10]对大肠杆菌表达晚期糖基化终末产物

受体蛋白时发生了糖基化修饰的研究中。但究竟发生了何种修饰还有待进一步的研究,一定程度上也提示了 HMGB1 在生物进化上的保守性和功能上的多样性。

总之,本研究发现,在不同种类细胞上,炎症刺激产生的细胞效应是不同的,作为脏器实质细胞,人肝癌细胞株 HepG2 对炎症刺激(LPS 和 HMGB1)仅能产生很少种类的细胞因子,其中 LPS 作用可上调 IL-6 和 IL-8 表达水平,而 HMGB1 则表现出量效的反作用,并且高浓度的 HMGB1 可明显抑制 LPS 对 HepG2 分泌细胞因子的诱导作用。这为理解脓毒症发展过程中两种重要的炎症因子共存且发生交互作用的机制提供了一定的实验依据。但 HMGB1 在脓毒症中是否还扮演有保护角色的角色是值得深入研究的问题之一。

参考文献

- [1] Erlandsson Harris H, Andersson U. Mini-review; the nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. *Eur J Immunol*, 2004, 34(6):1503-1512.
- [2] 徐佳,刘志锋,姜勇. 高迁移率族蛋白与真核基因表达调控. *生物化学与生物物理进展*, 2005, 32(5):397-402.
- [3] 郭爱华,姜勇. 从全身炎症反应综合征到脓毒性休克. *中国危重病急救医学*, 2002, 14(8):500-503.
- [4] Sharma S, Kumar A. Septic shock, multiple organ failure, and acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Pulm Med*, 2003, 9(3):199-209.
- [5] Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, 1999, 285(5425):248-251.
- [6] 唐道林,肖献忠. 高迁移率族蛋白-1 与脓毒症. *中国危重病急救医学*, 2004, 16(2):113-116.
- [7] Andersson U, Wang H, Palmblad K, et al. High mobility group-1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med*, 2000, 192(4):565-570.
- [8] 徐佳,刘志锋,王娟,等. 人高迁移率族蛋白 B1 细胞内定位及移位研究. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(6):338-341.
- [9] 刘靖华,李志杰,唐靖,等. 高迁移率族蛋白 1 诱导内皮细胞释放细胞因子的作用及其与脂多糖对白细胞介素 6 释放的协同效应. *中华医学杂志*, 2006, 86(17):1191-1195.
- [10] 赵善超,刘靖华,李志杰,等. 人晚期糖基化终产物受体胞质内段融合蛋白表达载体的构建与表达. *第一军医大学学报*, 2003, 23(12):1314-1316.

(收稿日期:2008-11-06 修回日期:2009-04-10)

(本文编辑:李银平)

中文核心期刊 中国科技核心期刊 中国精品科技期刊

欢迎订阅国家级期刊《中国中西医结合急救杂志》

全国各地邮局订阅,邮发代号:6-93,定价:每期 10 元,全年 60 元

2009 年以前的刊物可在本刊社邮购部购买,电话:022-23042150