

hIL-10 基因转导抑制大鼠心肌细胞 诱生炎症细胞因子

李锦华¹ 陈永雄¹ 张仕光¹ 廖晓星²

(中山医科大学附属第一医院 1 肾内科 2 急诊科; 广州, 510080)

摘要 目的: 观察人白细胞介素 10 (human Interleukin 10, hIL-10) 基因转导对脂多糖 (LPS) 诱导大鼠心肌细胞 (CMC) 的炎症细胞因子的产生及其基因表达的影响。方法: 通过重组逆转录病毒载体 pLX(IL-10)SN 将人 IL-10 基因导入大鼠 CMC, 应用 PCR, RT-PCR 和 ELISA; ① 检测 IL-10 基因的整合和表达; ② 观察 IL-10 基因转导对 LPS 诱导的 CMC 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的 mRNA 表达及白细胞介素- β (IL- β) 和 TNF- α 的蛋白质的产生的影响。结果: 外源性 IL-10 基因已整合到靶细胞染色体 DNA 并有效地表达, 并能抑制 LPS 诱导 CMC 产生 IL- β , TNF- α 。结论: 逆转录病毒载体介导的人 IL-10 基因转导能抑制 CMC 炎症效应中细胞因子的产生及其基因表达。

关键词 基因转移; 白细胞介素 10; 心肌; 炎症

中图分类号 R 542.2; R 392.32

hIL-10 Gene Transfer on Secretion of Inflammatory Cytokines in Rat Cardiomyocytes Induced

Li Jinhua Chen Yongxiong Zhang Shiguang Lao Xiaoxing

(1 Nephrology Department 2 Emergency Department, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen
University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

Abstract Objective: To investigate the effects of interleukin-10 (IL-10) gene transfer on secretion of inflammatory cytokines in rat cardiomyocytes (CMC) induced by LPS in vitro. **Method:** Exogenous human IL-10 (hIL-10) gene was transferred into rat CMC by retroviral vector pLX (IL-10)SN. The polymerase chain reaction (PCR), the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and ELISA were used ① to detect integration and expression of hIL-10 gene in rat CMC; ② to observe the effects of interleukin 10 gene transfer on secretion of inflammatory cytokines in rat CMC cells induced by LPS in vitro. **Result:** Human IL-10 gene had been integrated into the chromosomal DNA of the transfected rat CMC cells and hIL-10 gene could be expressed effectively by the transfected rat CMC cells. Exogenous IL-10 gene transfer could inhibit secretion of inflammatory cytokines IL- β and TNF- α in the transfected rat CMC at mRNA and protein level induced by LPS. **Conclusion:** Exogenous interleukin 10 gene transfer can inhibit secretion of inflammatory cytokines in CMC.

Subject headings gene transfer; interleukin-10; myocardium; inflammation

白细胞介素 10^[1] 是 T 辅助细胞产生的, 以抑制 Th1 细胞克隆的细胞因子合成为特点的多效免疫调节因子, 具有重要的抗炎及免疫抑制作用。本实验通过逆转录病毒载体将人 IL-10 基因转导至大鼠 (cardiomyocyte, CMC), 观察 IL-10 基因转移对 LPS 诱导的大鼠 CMC 生成 IL-1 和 TNF- α 的影响, 以探讨 IL-10 基因转导作为抗炎、抗排斥治疗手段的可能性及其作用。

1 材料和方法

1.1 重组逆转录病毒载体的包装与重组病毒感染滴度测定

含人 IL-10 全长 cDNA (0.61 kb) 的逆转录病毒载体 pLX (IL-10)SN 由本室构建^[2]。将重组载体 pLX (IL-10)SN 和空白载体 pLXSN 用 DOTAP

(Boehringer Mannheim) 导入 PA317 (军事医学科学院), 用 G418 (G1BCO BRL) 进行筛选; 以 NIH 3T3 细胞 (军事医学科学院) 测定重组病毒感染滴度。单位为 CFU/mL。

1.2 大鼠 CMC 的转染

按文献[3]的方法培养 Wistar 大鼠 (中山医科大学实验动物中心) CMC。抗 G418 抗性克隆 pLX (IL-10) SN 和 pLXSN 感染大鼠 CMC, 120 h 后取 CMC 按文献[4]的方法提取 DNA 和 RNA。

1.3 目的基因 IL-10 在 CMC 表达的检测

① PCR: 按照 PCR 试剂盒 (华美公司) 提供的方法进行。引物 A (pLXSN 1 511 ~ 1 530 bp; 5'-GT-CAAGCCCTTTGTACACCC-3', 引物 C (hIL-10 cDNA 546 ~ 525 bp; 5'-CCTGATGGT CTCAGTTTCGTATC-3') (引物由中国科学院上海生物工程研究中心合成, 以下引物相同) 检测目的基因 IL-10 在大鼠 CMC 的整合, 产物 679 bp。② RT-PCR: 按照 RT-PCR 试剂盒 (Promega) 提供的方法进行。上游引物 B (hIL-10 cDNA 129 ~ 150 bp; 5'-TCT CCG AGA TGC CTT TCA GCA GA-3'), 引物 C (见上) 作 RT-PCR 检测目的基因 IL-10 在大鼠 CMC 的转录, 产物 418 bp。以一对引物 (RAT GAPDH cDNA sense 21 ~ 40 bp; 5'-CAT AGA CAA GAT GGT GAA GG-3', anti-sense 590 ~ 571 bp; 5'-TCC ACA GTC TTC TGA GTG GC-3') 扩增大鼠看家基因 GAPDH 的 mRNA 为阳性内参照, 产物 570 bp。③ 按照 ELISA 试剂盒 (深圳晶美公司) 提供的方法检测目的基因 IL-10 在大鼠 CMC 的蛋白质表达。

1.4 IL-10 基因转移对 LPS 诱导大鼠 CMC 分泌细胞因子的作用

将第 2 代培养的 CMC 实验分组: ① 对照组: 未加 LPS (Difco Laboratory); ② 诱导组: 加 LPS (10 μ g/mL); ③ 转染抗 G418 抗性克隆 pLX (IL-10) SN, 72 h 后加 LPS (10 μ g/mL), 然后分别于 3, 6, 12, 24 h 收集上清液和细胞备检。按文献[4]的方法提取总 RNA。按照 RT-PCR 试剂盒提供的方法行 RT-PCR。以引物 (sense, 141 ~ 160 bp; 5'-CIT CTG TCT ACT GAA CTT CG-3', anti-sense, 538 ~ 519 bp; 5'-GTG CIT GAT CTG TTG TTT CC-3') 扩增大鼠 CMC 的 TNF α mRNA, 产物为 398 bp。以 1 对引物 (sense, 41 ~ 60 bp; 5'-CAT AGA CAA GAT GGT GAA GG-3', anti-sense, 485 ~ 466 bp; 5'-GAC AAT CTT GAG GGA GTT GTC-3') 扩增大鼠看家基因 GAPDH 的 mRNA

为阳性内参照, 产物为 445 bp。用薄层扫描仪 (CS-9000, 岛津, 日本) 检测 DNA 带的含量, 计算每一样品的 TNF α /GAPDH PCR 扩增产物的相对比值。按照 ELISA 试剂盒 (深圳晶美公司) 提供的方法检测 CMC 培养上清液, 各实验组的 IL-1 β , TNF α 含量。

1.5 资料统计

每个样品重复测定 6 次, 求均值, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用计算机医用统计程序 (SPSS/PC) 对数据进行 F 及 q 检验。

2 结果

2.1 重组病毒感染滴度测定

经 NIH3T3 测定, 重组病毒最高感染滴度为 6×10^5 CFU。

2.2 目的基因在转染大鼠 CMC 的表达

PCR 扩增产物在 15 g/L 琼脂糖电泳显示转染 pLX (IL-10) SN 载体的有特异性扩增的 pLXSN (1511 bp) 至 IL-10 cDNA 的片段, 为 679 bp, 而转染空白载体 pLXSN 的大鼠 CMC 则没有 (图 1); RT-PCR 扩增产物在 15 g/L 琼脂糖电泳分析显示转染载体 pLX (IL-10) SN 有特异扩增的 IL-10 mRNA 片段: 418 bp, 而转染空白载体 pLXSN 的大鼠 CMC 则没有 (图 2)。ELISA 检测显示 IL-10 基因在 pLX (IL-10) SN 转染大鼠 CMC 2 d 后开始表达, 以每个细胞每 24 h 产量计达 538 fg, 高峰在第 3 天为 1 755 fg, 第 7 天、第 14 天、第 28 天分别为 13. 58 fg、10. 57 fg、9. 63 fg。

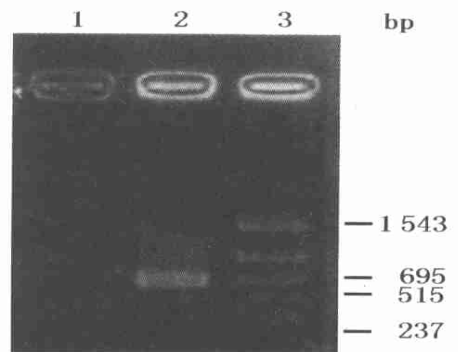


图 1 PCR 检测转染大鼠 CMC DNA 的 IL-10 基因

Fig. 1 PCR detection of IL-10 gene transferred into rat CMC

1. PCR product of rat CMC DNA (transfected with pLXSN vector). 2. PCR product of rat CMC DNA [transfected with pLX (IL-10) SN vector]; 679 bp. 3. PCR marker

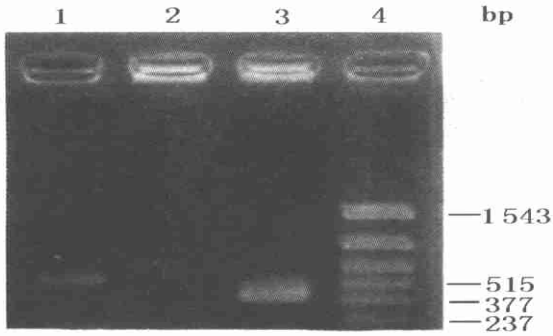


图2 RT-PCR检测转染大鼠CMC RNA的IL-10 mRNA

Fig. 2 RT-PCR detection of IL-10 mRNA in rat CMC

1. Internal control: RT-PCR product of rat GAPDH mRNA; 570 bp. 2. RT-PCR product of rat CMC mRNA (transfected with pLXSN vector). 3. RT-PCR product of rat CMC mRNA [transfected with pLX(IL-10)SN vector]; 418 bp. 4. PCR marker

2.3 IL-10 基因转移对大鼠 CMC 产生 IL-1 β , TNF α 蛋白质含量的影响

从表 1 和表 2 可看出: ①对照组, 正常大鼠 CMC IL-1 β 、TNF α 分泌量极低; ②诱导组, LPS 诱导 IL-1 β , TNF α 蛋白质的产生明显增加; 诱导组与对照组相比差异有显著性 ($P < 0.05$); ③IL-10 基因转移+LPS 10 mg/L 组各个时点 IL-1 β , TNF α 的产生与诱导组相比均减少, 有明显的抑制作用 ($P < 0.05$).

表 1 IL-10 基因转移对大鼠 CMC 产生 IL-1 β 的影响

Table 1 The effect of IL-10 gene transfer on secretion of Proinflammatory cytokine IL-1 β in rat Cardiomyocytes induced

(c / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)				
Group	3 h	6 h	12 h	24 h
Control	132 \pm 12	165 \pm 14	136 \pm 12	132 \pm 12
LPS 10 mg/L	378 \pm 31	554 \pm 39	788 \pm 39	787 \pm 22
IL-10 gene transfer+ LPS 10 mg/L	150 \pm 14	175 \pm 14	188 \pm 17	188 \pm 14

IL-10 gene transfer+LPS 10 mg/L compared with LPS 10 mg/L, $P < 0.05$

2.4 IL-10 基因转移对大鼠 CMC TNF- α mRNA 表达的影响

对照组, 正常大鼠 CMC TNF- α 分泌量极低, 经 LPS 诱导后 TNF- α /GAPDH 于 3, 6, 12, 24 h 分别为 0.458, 0.942, 0.808 和 0.620, TNF α mRNA 表达显著增加, IL-10 基因转移后, 用 LPS 诱导, TNF α /GAPDH 于 3, 6, 12, 24 h 分别为 0.365, 0.686, 0.638 和

0.421, IL-10 基因转移能显著抑制 LPS 诱导大鼠 CMC 产生 TNF α 。

表 2 IL-10 基因转移对大鼠 CMC 产生 TNF α 的影响

Table 2 The effect of IL-10 gene transfer on secretion of proinflammatory cytokine TNF α in rat Cardiomyocytes induced

(c / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)				
Group	3 h	6 h	12 h	24 h
Control	123 \pm 12	156 \pm 14	228 \pm 17	187 \pm 15
LPS 10 mg/L	455 \pm 32	1013 \pm 88	784 \pm 40	655 \pm 45
IL-10 gene transfer+ LPS 10 mg/L	201 \pm 19	274 \pm 27	304 \pm 27	225 \pm 20

IL-10 gene transfer+LPS 10 mg/L compared with LPS 10 mg/L, $P < 0.05$

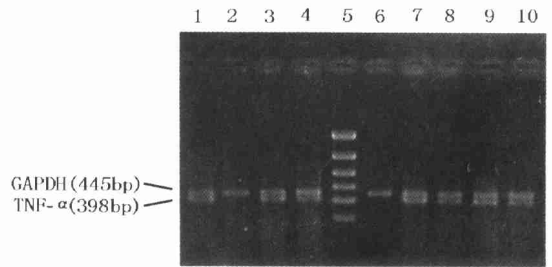


图 3 RT-PCR 检测大鼠 CMC TNF α mRNA

Fig. 3 RT-PCR detection of rat CMC TNF α mRNA

10, 8, 4, 2; RT-PCR products of rat CMC TNF α mRNA after adding LPS(10 mg/L) 3, 6, 12, 24 hours respectively, transfected with anti-G418 clone pLX(IL-10)SN. 9, 7, 3, 1: RT-PCR products of rat CMC TNF α mRNA after adding LPS(10 mg/L) 3, 6, 12, 24 hours respectively, not transfected with anti-G418 clone pLX(IL-10)SN. 5; PCR marker; 1543, 994, 695, 515, 377, 237 bp. 6; Control

3 讨论

心肌细胞(CMC)在病理状态下, 如心脏移植排斥反应, 急性心肌缺血缺氧, 心脏再灌注损伤, 充血性心力衰竭等, 可释放 TNF α , IL-1, IL-6 与 ICAM-1 等多种炎症介质, 此时 CMC 既是靶细胞, 又通过多种途径成为参与者, 其中通过分泌 TNF α , IL-1, ICAM-1, 活性氧等参与炎症损伤^{5, 6} 是它的重要效应。而细胞因子的自分泌和旁分泌作用所导致的不断放大的炎症效应是许多心脏疾病持续发展和不断恶化的一个重要环节。Roberts^[7] 等认为细胞因子可以通过不依赖于细胞因子诱导的 NO 合成影响钙的稳定性从而抑制心肌细胞的收缩功能, 而另一方面可以通过 IL-1 β , γ -IFN 介导的 NO 合成加

重心肌细胞的损伤^[8]。TNF α 不论对完整的左心室还是厚的心肌组织、体外培养的心肌细胞^[9] 都有负性肌力作用。TNF α 对心肌的短时(10~30 min)负性肌力作用主要由鞘氨醇介导^[8]，而长时(24~72 h)负性肌力作用主要由 NO 介导。TNF α 长时间的升高还引起左室功能失调、心肌病、肺水肿和左心室重构等。IL-1 引起心律失常，抑制心肌收缩，通过间接途径抑制 RNA 和蛋白质的合成^[10]。由于炎症效应是许多心脏疾病持续发展和不断恶化的一个重要环节，因而打断这一环节有可能延缓甚至逆转疾病的发展进程。

本研究所用的逆转录载体 pLXSN 是双表达载体，其外源性目的基因由 5'LTR 中的调控序列启动控制，而选择性基因 Neo 基因由 SV40 增强启动子调控。构建表达 IL-10 的逆转录病毒重组体 PLX(IL-10)SN，通过转染包装细胞 PA317 获得对大鼠 CMC 的感染性，外源性 IL-10 基因可以转移到大鼠 CMC 并稳定表达，它能抑制 CMC 炎症效应中细胞因子的过度产生及其基因表达，但对炎症因子的基础分泌没有影响。因而有可能利用 IL-10 基因转移抑制炎症因子所致的不断放大的炎症效应，在心脏疾病的炎症反应中发挥抗炎作用，从而延缓甚至逆转某些心脏疾病的发展进程。

参 考 文 献

- 1 Howard M. Biological properties of IL-10. *Immunol Today*, 1992, 13(67): 198
- 2 李锦华, 陈永雄, 刘 军, 等. 大鼠肾小球系膜细胞表

- 达人白细胞介素-10. *中山大学学报(自然科学版)*, 1998, 37(增刊): 88
- 3 王光武, 王 凡. 氢过氧化枯烯对心肌细胞 DNA 的影响. *白求恩医科大学学报*, 1996, 22(3): 226
- 4 王申五主编. *基因诊断技术—非放射性操作手册*. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1992. 39, 46, 109~111
- 5 Kapadia S, Lee J R, Torre A G, *et al*. Tumor necrosis factor gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest*, 1995, 96(2): 1042
- 6 Hawkins H K, Entman M L, Jessica Y Z, *et al*. Acute Inflammatory reaction after myocardial ischemic injury and reperfusion development and use of a neutrophil-specific antibody. *Am J Pathol*, 1996, 148(6): 1957
- 7 Roberts A B, Vodovotz Y, Roche N S, *et al*. Role of nitric oxide in antagonistic effects of transforming growth factor-beta and interleukin-1 beta on the beating rate of culture cardiac myocytes. *Mol Endocrinol*, 1992, 6(11): 1921
- 8 Dachun Wang, McMillin J B, Roger B, *et al*. Response of the neonatal rat cardiomyocyte in culture to energy depletion: effects of cytokines, nitric oxide, and heat shock proteins. *Lab Invest*, 1996, 75(6): 809
- 9 Weisensee D, Bereiter H J, Schoeppe W, *et al*. Effects of cytokines on the contractility of cultured cardiac myocytes. *Int J Immunopharmacol*, 1993, 15(5): 581
- 10 Hosenpud J D, Campbell S M, Pan G. Indirect inhibition of myocyte RNA and protein synthesis by interleukin-1. *J Mol Cell Cardiol*, 1990, 22(2): 213

(1999-03-15 收稿 1999-04-21 修回)

· 简 讯 ·

采用经鼻内窥镜新技术成功修补先天性脑膜膨出

1999年4月13日,中山一院耳鼻喉科张湘民副教授等采用经鼻内窥镜新技术为一位13岁女童成功地修补了先天性脑膜脑膨出手术。她5岁时,因右鼻塞,在当地医院诊断为“鼻息肉”,先后3次接受鼻息肉摘除手术。术后鼻塞症状有所改善,但反复出现流涕、高热、头痛、呕吐,甚至昏迷等症状。

今年2月下旬,女童转到耳鼻喉科就诊,诊断为“脑膜脑膨出合并颅内感染”。经内窥镜检查发现:由于女童颅底骨缺损畸形,致使脑膜和脑组织膨出到右鼻嗅沟里,外观象花生米、灰白色、状似鼻息肉。明确了诊断,急待手术。传统的修补手术方法必须开颅进行,但他为使女童免受开颅创伤的痛苦,大胆采用新技术,张湘民副教授等在内窥镜下为其切除了膨出的脑膜及失去功能的脑组织,并用中鼻甲粘膜翻转修补其颅骨缺损,使脑组织不再暴露到鼻腔内而易受感染,此手术获成功。出院时经复查,颅底粘膜已完全愈合,女童无任何不适症状。

据了解,先天性脑膜脑膨出是一种较罕见疾病。经查国内外文献,尚未见利用经鼻内窥镜成功修补先天性脑膜脑膨出的报道。

(吴金泉)