

逆转录病毒介导的 vIL-10 表达对小鼠 MLC 和心脏移植存活期的影响

钟建辉, 杨彦强, 陈永雄, 黄凌虹, 余学清

(中山医科大学附属第一医院肾内科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨逆转录病毒介导的病毒白介素 10(vIL-10) 基因表达对小鼠混合淋巴细胞培养(MLC)反应和心脏移植存活期的影响。【方法】将 vIL-10 cDNA 克隆到逆转录病毒载体 pLXSN, 取 vIL-10 重组逆转录病毒上清加入 BABL/c 和 CBA/J 混合淋巴细胞中培养, 液闪测量。在新生 CBA/J 小鼠心脏移植时, 将 vIL-10 上清 10^6 IU(1 000 pfu) 注入移植心脏内, 观察其对心脏移植存活期的影响。【结果】vIL-10 抑制小鼠混合淋巴细胞反应(MLR), 其抑制效应随 vIL-10 病毒上清的增加而增加, 逆转录病毒介导的 vIL-10 表达使小鼠心脏移植存活期从 (11 ± 1) d 延长至 (28 ± 3) d ($P < 0.01$)。【结论】逆转录病毒介导的 vIL-10 表达抑制小鼠 MLR, 使小鼠心脏移植存活期明显延长。

关键词: 白细胞介素 10/ 药理学; 淋巴细胞培养试验, 混合; 心脏移植; 移植存活/ 药物作用

中图分类号: R 654.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)03-0209-03

The Effects of Retrovirus-mediated Transfer of Viral IL-10 Gene on Murine MLC and Cardiac Allograft Survival

ZHONG Jian-hui, YANG Yan-qiang, CHEN Yong-xiong, HUANG Lin-hong, YU Xue-qing

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

Abstract:【Objective】To study the effects of retrovirus-mediated transfer of viral IL-10 (vIL-10) gene on murine mixed lymphocytes culture (MLC) and cardiac allograft survival. 【Method】A retroviral vector carrying vIL-10 cDNA was constructed. The pseudovirus was used to the mixed lymphocytes culture between spleen cells of BABL/c and CBA/J. The samples were counted by liquid scintillation. In order to examine the effects of vIL-10 on murine cardiac allograft survival, 10 microliters of viral culture supernatants (1 000 pfu) were directly injected to the graft at the time of transplantation. 【Results】The murine mixed lymphocyte reaction (MLR) was inhibited by the vIL-10, its suppressive effect was dose dependent, retroviral-mediated gene transfer and expression of vIL-10 prolonged murine cardiac allograft survival from (11 ± 1) d to (28 ± 3) d ($P < 0.01$). 【Conclusions】Retrovirus-mediated gene transfer of viral interleukin-10 inhibits murine mixed lymphocyte reaction, prolongs murine cardiac allograft survival significantly.

Key words: interleukin-10/ pharmacology; lymphocyte culture test, mixed; heart transplantation; graft survival/ drug effects

白介素 10 为巨噬细胞及 Th2 细胞产生的一种细胞因子合成抑制因子, 它能抑制 Th1 细胞中 IFN- γ 等因子的合成, 下调单核巨噬细胞 MHC II 类抗原及其共刺激信号 B7 和粘附分子(ICAM-1)的表达, 还具有促进胸腺细胞, T、B 淋巴细胞增殖的活性^[1]。病毒白介素 10(vIL-10)由 EB 病毒产生, 与人和鼠细胞白

介素 10 具有高度同源性。vIL-10 也能对机体的免疫应答产生负调节作用, 且 vIL-10 无刺激 T 细胞增殖的活性^[2]。vIL-10 基因在移植器官中的表达, 可明显减弱供体抗原的呈递, 减轻或避免受体对移植物的排斥反应, 从而使移植存活期延长。本研究将我们构建的 vIL-10 cDNA 逆转录病毒重组体用于小鼠

收稿日期: 1999-07-08

基金项目: 中山医科大学科研基金资助项目(1997 年度)

作者简介: 钟建辉(1963-), 男, 湖南双峰人, 硕士, 助理研究员。

混合淋巴细胞培养(MLC)及移植小鼠心脏中,以观察逆转录病毒介导的 vIL-10 表达对小鼠混合淋巴细胞反应(MLR)及心肌移植生存期的影响。

1 材料与方 法

1.1 vIL-10 逆转录病毒重组体的构建

将含 vIL-10 cDNA (0.695 kb) 质粒 pcDSRV 用 *Bam*HI 酶切后,将目的基因重组入 pLXSN (5.874 kb) 中,斑点杂交筛选阳性克隆,用 *Xho*I 酶切鉴定,获得含 vIL-10 cDNA 且为正向连接的逆转录病毒载体质粒 pLVSN,将此重组质粒和脂质体一起转染包装细胞 PA317,经 G418 筛选获得阳性克隆,收集含 vIL-10 的逆转录病毒上清待用。详见文献[3]。

1.2 实验动物

混合淋巴细胞反应用 BABL/c (H-2^d) 及 CBA (H-2^k) 雌性小鼠,鼠龄 8~10 周。心脏移植的供体为 CBA/J 新生小鼠(生后 48 h 内),受体为 BABL/c 二级小鼠,雌性,鼠龄 8~10 周。以上动物均购自中山医科大学实验动物中心。

1.3 小鼠混合淋巴细胞培养

取出小鼠脾脏,在 Hanks 液 中将其轻轻研碎,用加淋巴细胞分离液和离心的方法去除其中的红细胞,淋巴细胞用含体积分数为 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液稀释,至细胞数为 10⁶/mL,将 BABL/c 淋巴细胞及 CBA/J 淋巴细胞以 1:1 混合,取 96 孔培养板,加 150 μ L 混合淋巴细胞,50 μ L 不同稀释度的 vIL-10 上清。置 37 $^{\circ}$ C,体积分数为 5% CO₂ 培养箱中培养 72 h,收获前 18 h 加 ³H TdR 3.7 \times 10⁴ Bq/孔,实验结果以 3 复孔 CPM 的平均数 (min⁻¹) 表示。

1.4 小鼠心脏移植

按文献[4]稍加改进,BABL/c 二级小鼠用 5 g/L 戊巴比妥腹腔麻醉后,用 1 g/L 新洁尔灭局部消毒,于耳廓背侧中线之下 1/3 处作 3~4 mm 横切口,持眼科剪向耳尖方向钝性分离皮下组织,使成一个 3~4 mm 深囊腔,取新生 CBA 小鼠心脏于无菌 Hanks 液内搏动 1 至 2 次后,置于受鼠耳后囊腔,切口缝合一针。将重组病毒滴度噬斑形成单位 (pfu) 为 100 \times 10⁵/L 的 vIL-10 上清 5 μ L (或 10 μ L) 注入移植心脏内。术后 6 d 起,间日检测移植心脏的心电活动。以心电活动消失作为排斥反应的终点。如果术后 8 d 仍未出现心电,则作为移植手术失败,不列入统计。

1.5 统计方法

实验数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, *t* 检验显著性。

2 结 果

2.1 vIL-10 对 BABL/c 及 CBA/J 混合淋巴细胞培养的影响

vIL-10 对 BABL/c 及 CBA/J 混合淋巴细胞培养的影响如表 1。

用统计软件 JMP 3.2, 分别将混合淋巴细胞反应(MLR)的计数值及 vIL-10 量取对数,作 lg MLR 关于 lg vIL-10 的回归分析,得回归方程为 $y = 6.672 - 1.182x$ 。经 *t* 检验,回归系数不为零。BABL/c 及 CBA/J 小鼠混合淋巴反应被 vIL-10 上清所抑制,随着 vIL-10 上清量的增加,抑制效应亦随之加大(表 1, 图 1)。

表 1 vIL-10 表达对 BABL/c 和 CBA/J 小鼠混合淋巴细胞反应(MLR¹⁾) 的影响

Table 1 The effect of vIL-10 expression on mixed lymphocytes culture between BABL/c and CBA/J mice

<i>n</i> (vIL-10 pfu)/1	<i>n</i> (MLR, cpm)/min ⁻¹	<i>r</i> (Suppression rate)/ (%)
0	4 996 \pm 315	
500	3 247 \pm 237	35
1 000	1 116 \pm 160	78
2 000	0 745 \pm 131	85
4 000	0 249 \pm 100	95

1) MLR: mixed lymphocyte reaction

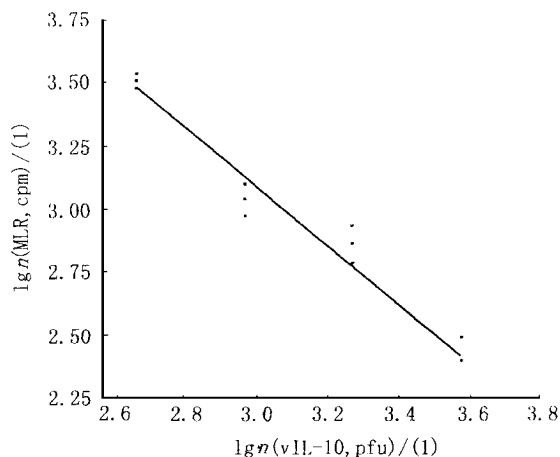


图 1 vIL-10 基因表达对 BABL/c 及 CBA/J 小鼠混合淋巴细胞培养的抑制作用

Fig. 1 The inhibitory of vIL-10 gene expression on mixed lymphocytes culture between BABL/c and CBA/J mice

2.2 vIL-10 上清对小鼠心脏移植存活期的影响

由表 2 可见,与未含目的基因的空载体相比, vIL-10 显著延长小鼠心脏移植存活期, vIL-10 量增

加,移植心脏存活期延长。

表2 vIL-10 逆转录病毒重组体上清对小鼠心脏移植存活期的影响

Table 2 The effect of vIL-10 retroviral vector on murine cardiac allograft survival

<i>n</i> (vIL-10, pfu)/1	<i>n</i>	<i>t</i> (Mean survival)/d	<i>P</i>
0	10	11 ± 1	
500	8	16 ± 2 ¹⁾	< 0. 01
1 000	8	28 ± 3 ²⁾	< 0. 01

1) Compared with the control; 2) Compared with vIL-10 500 (pfu)

3 讨论

在移植物植入受体后,淋巴细胞被致敏。致敏的淋巴细胞与移植物靶器官发生作用,产生 IL-2, GM-CSF 等,使致敏 T 细胞聚集于移植物,并受移植物抗原的刺激而被激活,在局部释放 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IFN- γ 等,其中 IFN- γ 能增强淋巴细胞表达粘附分子-1 (ICAM-1),激活单核细胞,刺激 IL-1, IL-6, TNF, TB4 (白三烯 B4) 的产生。这些介质的产生和释放,使炎症反应持续和发展。GM-CSF, IL-1, IL-6 和 TB4 等促使淋巴细胞成熟和分化,触发对移植物的免疫排斥反应。移植排斥仍是移植物长期存活的主要障碍,目前预防排斥的对策主要为应用环孢素 A 等系统性免疫抑制剂。该疗法除了降低机体的免疫力外,抗排斥药物长期应用所引起的毒副作用亦是一不容忽视的问题。因此,寻找更好的预防移植排斥,延长移植器官(或组织)的存活成为研究的热点。基因研究的深入除了更进一步阐明移植排斥的机理以外,也为探索预防排斥开辟了新的途径。在器官移植前或在供体器官中引入一些具有免疫调节作用的基因,使其发挥局部或供受体特异性免疫抑制作用,即可避免长期应用系统性免疫抑制剂,而达到延长移植器官长期存活的目的。

vIL-10 是 EB 病毒 BCRF1 编码的,与 IL-10 具有高度同源性的蛋白质,具有抑制 Th1 细胞合成因子 IL-2, IL-6, IFN- γ 等作用,被称为细胞因子合成抑制因子。并具有抑制单核巨噬细胞 MHC II 及 B7 表

达,抑制抗原呈递,抑制抗原特异性淋巴细胞产生等作用,从而抑制受体对移植物的排斥。Pequet-Navarro 等^[5]在混合皮肤淋巴细胞反应(MELR)中加 IL-10,证明 IL-10 能抑制人郎格罕细胞介导的同种异体 MELR 反应。为观察 vIL-10 基因转移对小鼠混合淋巴细胞反应的影响,我们将筛选到有 vIL-10 蛋白表达的 vIL-10 上清加入小鼠混合淋巴细胞反应(MLR)中,可见 MLR 能被逆转录病毒介导的 vIL-10 所抑制,且其抑制效应随 vIL-10 上清量的增加而增加。在小鼠心脏移植实验中,vIL-10 基因表达使心脏移植存活期延长。此结果与 Qin^[6,7]等的报道一致,说明 vIL-10 基因表达可抑制移植排斥反应而延长小鼠移植心脏的存活期。

参考文献:

- [1] Willems F, Marchant A, Delvile J P, *et al*. Interleukin 10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes[J]. *Eur J Immunol*, 1994, 24(4): 1007.
- [2] Malefyt D W, Haanen R J, Spits H, *et al*. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of Class II major histocompatibility complex expression[J]. *J Exp Med*, 1991, 174(4): 915.
- [3] 杨彦强,陈永雄,张仕光,等. vIL-10 逆转录病毒载体构建及在鼠成纤维细胞中的表达[J]. *中山医科大学学报*, 1998, 19(1): 31.
- [4] 史美浩,马宝骊,余 涿. 小鼠耳后心脏/心肌组织移植模型之探讨[J]. *上海免疫学杂志*, 1981, 1(3): 41.
- [5] Pequet-Navarro J, Moulon C, Caux C, *et al*. Interleukin-10 inhibits the primary allogeneic T cell response to human epidermal Langerhans cells[J]. *Eur J Immunol*, 1994, 24(4): 884.
- [6] Qin L H, Chavin K D, Ding Y Z, *et al*. Retrovirus-mediated transfer of Viral IL-10 Gene prolongs murine cardiac allograft survival[J]. *J Immunol*, 1996, 156(6): 2316.
- [7] Qin L H, Pahud D R, Ding Y, *et al*. Efficient transfer of genes into murine cardiac grafts by starburst polyamidoamine dendrimers. *Hum Gene Ther*, 1998, 9(4): 553.

(编辑 张敏瑞)