

vIL-10 逆转录病毒载体构建及在鼠成纤维细胞中的表达

杨彦强 陈永雄 张仕光 钟建辉 纪玉莲 吴培根 唐世聪

(中山医科大学附属第一医院肾脏病研究所; 广州, 510080)

摘要 目的: 探讨 vIL-10 的免疫抑制作用, 为应用 vIL-10 进行免疫基因治疗打基础。方法: 用基因重组技术将 vIL-10cDNA 克隆到逆转录病毒载体 pLXSN, 并用脂质体法导入包装细胞 PA317, 取其上清感染小鼠成纤维细胞 NIH3T3。结果: 经筛选获得抗 G418 的 NIH3T3 阳性克隆, 用 RT-PCR, ELISA 方法检测到 vIL-10 的表达, 用 $^3\text{H-TdR}$ 法检测到 vIL-10 对 MLR 的抑制作用。结论: 构建 vIL-10 逆转录病毒表达载体并转染小鼠成纤维细胞, 初步证实 vIL-10 具有免疫抑制作用。

关键词 白细胞介素 10; 逆转录病毒属, MLV 相关; DNA 重组

中图分类号 R 373; 392.11

CONSTRUCTION OF RETROVIRAL VECTOR CARRYING VIRAL INTERLEUKIN-10 AND THE EXPRESSION OF vIL-10 IN MURINE FIBROBLAST CELLS

Yang Yanqiang Chen Yongxiong Zhang Shiguang
Zhong Jianhui Ji Yulian Wu Peigen Tang Shicong

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

Abstract Objective: To study the role of immunosuppression of vIL-10 in order to set up foundation of its application in immunogene therapy. **Methods:** Retroviral vector carrying vIL-10 cDNA was constructed and introduced into package cell line PA317 by the lipofectin transfection. The pseudovirus producing cell clone was acquired by screening with G418, then the pseudovirus was used to infect murine fibroblast cell NIH3T3. **Results:** After screening, the NIH3T3 cells expressing vIL-10 was obtained. The expression of vIL-10 was detected by RT-PCR, ELISA and the role of inhibition of vIL-10 to MLR was determined with $^3\text{H-TdR}$. **Conclusions:** The supernatant of infected NIH3T3 cells are immunosuppressive to MLR and vIL-10 may serve as an ideal material for inhibiting immunoresponse in some diseases.

Subject headings interleukin-10; retroviruses, MLV-related; DNA recombination

病毒白细胞介素 10 (vIL-10) 是 EB 病毒 (EBV) 基因组中一段开放读码区 BCRF1 编码, 与鼠和人的 IL-10 具有高度的同源性的蛋白质^[1]。IL-10 被称为细胞因子合成抑制因子 (CSIF), 对机体的许多免疫应答产生负调节作用。vIL-10 和 IL-10 具有许多相同的生物活性, 如抑制 Th1 细胞 IFN- γ 等的表达, 下调单核细胞-巨噬细胞 MHC II 类抗原及其共同刺激信号 B $_7$ -粘附分子 (ICAM-1) 的表达^[2]。vIL-10 抑制 Th1 细胞的激活及降低巨噬细胞抗原提呈功能及其辅助作用, 在器官移植中

可减少抗原特异性 T 淋巴细胞的产生^[3], 对临床器官移植^[4] 抗免疫排斥有重要作用。因此, 如果将 vIL-10 作为局部免疫抑制剂转移到移植物, 将可能在局部抑制受体对移植物的免疫应答, 对延长移植物的存活有重要意义。本研究将 vIL-10 cDNA 构建到逆转录病毒载体 pLXSN 上, 经包装细胞包装后感染小鼠成纤维细胞 NIH3T3, 使其表达 vIL-10, 并对其生物活性进行了研究, 为进一步在器官移植中的免疫基因治疗打下了基础。

1 材料与方 法

1.1 生物材料

含 vIL-10 cDNA (0.695 kb) 的质粒 pcDSRV 由美国 DNAX Institute 的 KW Moore 教授惠赠; 反转录病毒载体质粒 pLXSN (5.874 kb) 由 Fred Hutchinson Cancer Research Center AD Miller 教授惠赠; 大肠杆菌 JM 103 为本室保存菌株; 双嗜性包装细胞 PA317 (中山医科大学免疫教研室), NIH3T3 (暨南大学分子医学中心); 近交系小鼠 BALB/C、CH57L/6 (中山医科大学实验动物部)。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Bam*HI, *Xho*I, PCR 试剂盒, digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim 公司); T4DNA 连接酶, 碱性磷酸酶 CIP, 总 RNA 提取试剂盒 (Promega 公司); 丙烯酰胺, N-N' 亚甲基双丙烯酰胺 (Serva 公司); DMEM/F12 培养基, G418 (GIBCO BRL 公司); PCR 引物 5' → 3' ATGGAGC-GAAGGTTAGTGGTC, 3' → 5' ACTTTGTTCT-CACGGCAG (上海细胞生物学研究所合成); JES3-9D7, JES3-B11 (Pharminge 公司); ³H-TdR (中国原子能研究所)。

1.3 pLvSN 重组体的构建及鉴定

1.3.1 构建 pLvSN 重组体 按文献[5]方法进行。

1.3.2 斑点杂交筛选重组体 将转化重组质粒的 JM103 菌株, 涂布于含氨苄青霉素的 SOB 培养基上, 16 h 后挑出 13 个孤立菌落经 LB 培养基小量扩增, 硷裂解法提取质粒 DNA, 10 μL TE 液溶解, 点膜, 杂交过夜, 按 Digoxigenin 检测试剂盒操作洗膜, 显色。

1.3.3 重组质粒 vIL-10 cDNA 插入方向的鉴定

将上述斑点杂交阳性结果的重组质粒扩增, 提取 DNA, RNA 酶消化, 限制性内切酶 *Xho*I 酶切鉴定方向, 在 pLXSN (5.874 kb) 多克隆位点上有 *Bam*HI, *Xho*I 等位点, 其中, *Xho*I 在 *Bam*HI 位点的上游, 本研究选取 *Bam*HI 为插入点。vIL-10 片段, (0.69 kb) 近 3' 末端也有 1 个 *Xho*I 酶切位点。因此, 用 *Xho*I 酶切, 如果 vIL-10 插入方向为正向连接, 则恰好将插入片段切下, 产生 5.874 kb 和 0.695 kb 两个片段。如果为反向连接, 则在重组质粒中因插入片段 3' *Xho*I 与多克隆位点上的 *Xho*I 相距很近, 故只产生 1 条 6.569 kb 的片段。

重组体用单一酶切位点的限制性内切酶 *Hpa*I 酶切分析为线性 6.569 kb 的片段。

1.4 包装细胞 PA317 的转染与病毒上清效价测定

用脂质体法 (Lipofectin AMINE), 按脂质体试剂盒 (GIBCO BRL) 说明书方法转染包装细胞 PA317, 并经 G418 (300 mg/L) 筛选获得阳性克隆。按文献[6]方法测定反转录病毒载体效价, 经 G418 选择后, 挑选 NIH3T3 抗性克隆并扩增培养, 以检测 vIL-10 的表达。

1.5 vIL-10 在鼠成纤维细胞 NIH3T3 表达的检测

用异硫氰酸胍一步法提取细胞总 RNA, 随机引物法逆转录为 cDNA, 以 vIL-10 特异性引物进行 RT-PCR, 以检测 vIL-10 mRNA 的表达。反应条件: 97 °C 变性 5 min; 96 °C 60 s, 60 °C 90 s, 72 °C 60 s, 30 个循环。取 5 μL PCR 产物 2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。取上述培养 24 h 的 NIH3T3 细胞上清, 按 ELISA 试剂盒操作说明检测 vIL-10 在蛋白质水平的表达, 其中 JES3-9D7 作为包被抗体, JES3-B11 作为检测抗体。

1.6 vIL-10 生物活性分析

vIL-10 对体外淋巴细胞混合培养 (MLR) 的抑制效应: 取近交系小鼠 BABL/C 和 CH57BL/6 脾细胞, 以 BABL/C 脾细胞作为刺激细胞, CH57BL/6 脾细胞作为效应细胞。脾细胞经密度梯度离心, PBS 洗涤 2 次, Tris-NH₄CL 溶解红细胞, 以 5 × 10⁵ 的效应细胞及 30 Gy ¹³⁷Cs 照射的刺激细胞在含 10% FCS 的 RPMI1640 培养基混合培养。实验组每孔加入不同比例稀释的重组质粒 pLvSN 转染 NIH3T3 细胞的上清, 对照组每孔加入相同比例稀释的空载体 pLXSN 转染的 NIH3T3 上清。96 孔板 37 °C, 5% 的 CO₂ 培养箱培养 6 d。所有实验均设 4 个复孔重复 3 次, 应用 ³H-TdR 法检测淋巴细胞的增殖状态, 在最后培养结束前 6 h 加入 1 μCi 的 ³H-TdR, 收集细胞用 β 液闪仪测定 ³H-TdR 渗入率。

2 结 果

2.1 反转录病毒载体的构建

经斑点杂交获得阳性克隆 7 个, 结果显示 3, 4, 7, 8, 9, 12 为阳性, 1, 2, 5, 6, 10, 11, 13 为阴性 (见图 1), 阳性结果表明 vIL-10 已克隆至 pLXSN 载体中。

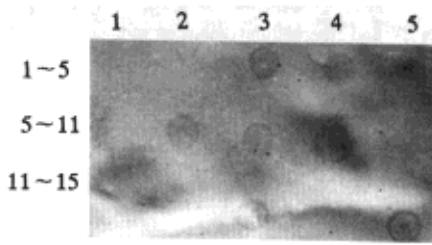


图 1 重组质粒与 vIL-10 探针斑点杂交

Fig. 1 Patterns of hybridization of recombinant plasmid with vIL-10 cDNA probe

Positive clone: 3 4 7 8 9 12; Negative clone: 1, 2, 5, 6, 10, 11, 13; Negative control: 14; Positive control: 15

小量扩增碱裂解法提取 DNA, *Xho* I 酶切鉴定方向, 其中 3 个为正向, 4 个为反向插入, 分别取正、反向重组体酶切分析, 见图 2。

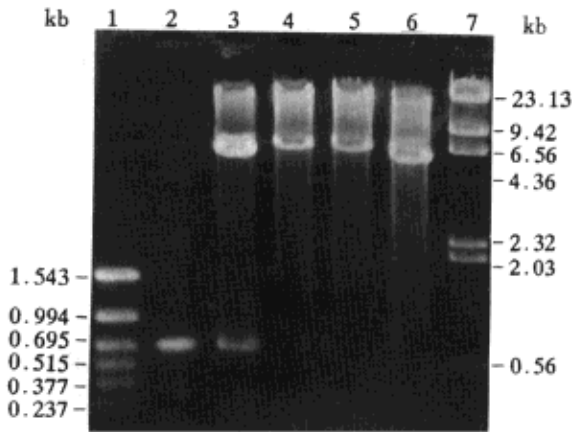


图 2 重组质粒的鉴定(0.8% 琼脂糖凝胶电泳)

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid

Lane 1: PCR Markers (1.54 kb, 0.99 kb, 0.69 kb, 0.52 kb, 0.38 kb, 0.24 kb); Lane 2: vIL-10cDNA fragment; Lane 3, 4. recombinant plasmid/ *Xho* I; Lane 5: recombinant plasmid/ *Hpa* I, Lane 6: plasmid pLXSN; Lane 7: DNA/ *Hind* III Markers (23.1 kb, 9.4 kb, 6.65 kb, 4.32 kb, 2.32 kb, 2.03 kb, 0.56 kb)

2.2 转染 PA317 细胞和逆转录病毒效价测定

用 lipofect AMINE 将 pLXSM vIL-10 重组质粒导入双嗜性包装细胞 PA317, 在 G418 选择培养 7d 后, 大量 PA317 细胞被杀死, 仅见散在的单个 G418 抗性细胞, 3~4 周后单个细胞逐渐形成克隆。收集 PA317 细胞上清感染 NIH3T3 细胞, 以 G418 筛选根据克隆形成数计算病毒滴度为 1×10^7 。

2.3 vIL-10 表达鉴定

RT-PCR 产物电泳分析, 结果表明感染外源性

基因的 NIH3T3 细胞扩增出 378 bp 的片段, 而感染空载体的 NIH3T3 细胞及未予感染的 NIH3T3 细胞无相应产物, 说明 vIL-10 在感染的 NIH3T3 中的表达。进一步通过 ELISA 检测, 转染重组质粒 pLvSN 逆转录病毒表达载体的 NIH3T3 细胞, 其上清 vIL-10 的表达 24 h $> 20\ 000\ \text{pg}/10^6$, 而转染空载体及空白对照 NIH3T3 细胞均未检测到 vIL-10 的表达。

2.4 vIL-10 对体外淋巴细胞混合培养的抑制

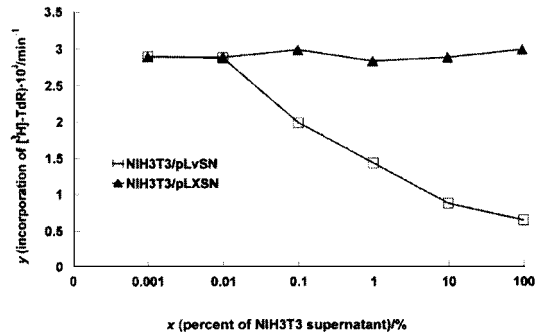


图 3 转化 NIH3T3 细胞上清中 vIL-10 对 MLR 的影响

Fig. 3 The inhibition to MLR of vIL-10 in the supernatant of NIH3T3 cells transformed

转化上清中 vIL-10 对 MLR 的影响 ($^3\text{H-TdR}$ 法), 如图 3 所示, 随着 NIH3T3/pLvSN 浓度的增加, 出现 vIL-10 对 MLR 明显的抑制作用, 而对照组 NIH3T3/pLXSN 却对 MLR 无影响。

3 讨论

逆转录病毒载体介导的基因转移是将外源性基因导入靶细胞的有效手段, 它不但能高效地将外源基因转入靶细胞, 而且能将外源基因有效地整合到宿主细胞基因组中, 并随细胞分裂而传给子代, 在基因治疗中被广泛应用。本研究用的逆转录病毒载体来源于 Moloney 小鼠白血病病毒 (MoMLV), 是 LN 载体的一种, 是 Miller^[7] 等在逆转录病毒载体 N2 基础上构建的新一代载体。在结构上属 VIP (Vectors with internal promotor 带有内部启动子的载体), 不仅去除了 gag, pol, env 等结构基因而且将 gag 基因的翻译起始密码子 ATG 变成终止子 TAG, 将 5' 端 MoMLV 序列用相应的小鼠肉瘤病毒 (MoMSV) 序列所取代, 进一步减少了同源重组的概率, 使逆转录病毒载体介导的基因转移隐患大大降低, 具有较高的安全性^[7]。经转染包装细胞 PA317 后获得较高的病毒滴度, 是其它逆转录

病毒载体的 10 ~ 15 倍^[8]。一些研究人员利用 pLXSN 载体已成功地对 ADA^[9]、凝血因子 VIII^[10] 等进行了基因转移及表达的研究。

本研究构建的逆转录病毒载体带有 EB 病毒开放读码区 BCRF1 基因, 编码 vIL-10。vIL-10 是细胞因子合成抑制因子(CSIF)^[2], 具有抑制 Th1 细胞细胞因子合成及抑制单核巨噬细胞抗原提呈功能^[3] 等的作用。应用基因重组技术构建 vIL-10 逆转录病毒重组体, 通过酶切鉴定获得正向插入的重组体, 并通过脂质体法转入包装细胞 PA317, 进而用 PA317 上清感染小鼠成纤维细胞 NIH3T3 细胞, 获得分泌 vIL-10 的细胞克隆, 为研究 vIL-10 的生物活性及进行 vIL-10 基因转移打下了基础。进一步通过 MLR 初步探讨了 vIL-10 的生物学功能, 表明 vIL-10 对 MLR 的抑制作用, 在一定程度上说明 vIL-10 的免疫抑制作用, 对于抑制移植物抗原诱发的免疫应答具有重要意义, 并为进一步研究在以 vIL-10 为目的基因, 以移植肾系膜细胞为中介细胞的基因治疗, 在导入移植肾, 发挥局部免疫抑制作用, 从而避免全身应用免疫抑制剂所产生的毒副作用, 对于器官移植的抗排斥治疗可能有重要的意义。

参 考 文 献

- 1 Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, *et al.* Homology of cytokine inhibitory factor IL-10 to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science*, 1990, 248(4960): 1230
- 2 Willems F, Marchant A, Delville JP, *et al.* Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expres-

- sion on human monocytes. *Eur J Immunol*, 1994, 24(4): 1007
- 3 de Waal Malefyt R, Haanen RJ, 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 Exp Med*, 1991, 174(4): 915
- 4 Qin L, Chavin KD, Ding Y, *et al.* Multiple vectors effectively achieve gene transfer in a murine cardiac transplantation model: immunosuppression with TGF- β or vIL-10. *Transplantation*, 1995, 59(6): 8
- 5 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 53~85
- 6 Ausubel F M, Roger B, Kigerston RE, *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology*. 3rd ed. USA: John Wiley & Sons Inc. 1995. 1~55
- 7 Miller AD, Resman G J. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques*, 1989, 7(9): 980
- 8 Dones O, Mulligen RC. Safe and efficient generation of recombinant retrovirus with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(17): 6360
- 9 Kaleko M, Garcia JV, Osborne WRA, *et al.* Expression of human adenosine deaminase in mice after transplantation of genetically-modified bone marrow. *Blood*, 1990, 75(8): 1733
- 10 Lynch C, Israel DL, Kaufman RJ, *et al.* Sequences in the coding region of clatting factor VIII act as dominant inhibitors of RNA accumulation and protein production. *Human Gene Therapy*, 1993, 4(3): 259

(1997-04-09 收稿 1997-11-05 修回)

简 讯

我校正式获准组建“卫生部医药生物工程技术研究中心”

我校申报组建“卫生部医药生物工程技术研究中心”于 1997 年 8 月 23 日通过了卫生部科教司组织的专家论证, 12 月 3 日正式获卫生部批准组建, 聘请李全贞教授为该中心主任, 中国工程院院士、上海市医学遗传研究所曾溢滔教授为工程技术委员会主任, 颜光美教授为副主任。

(冯世容)