论著

文章编号:1000-5404(2005)08-0724-03

人白介素-10在NIH3T3细胞中的表达及生物学效应的初步观察

汪小平,赵雄飞,易绍萱,陈 渝,太光平 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 观察IL-10的免疫抑制作用。**方法** 将构建好的pLXHIL-10载体,经包装细胞PA317包装后感染小鼠成纤维细胞株NIH3T3,用ELISA和原位杂交的方法检测hIL-10的表达,并对其生物学活性进行初步观察。**结果** 检测到感染细胞中有hIL-10 mRNA的表达,感染细胞培养上清中存在hIL-10,证实感染细胞培养上清对混合淋巴细胞培养反应有明显的抑制作用。**结论** hIL-10可抑制混合淋巴细胞反应。

关键词: 白介素-10;免疫抑制;基因表达;NIH3T3

中图法分类号: R392.11; R392.13 **文献标识码:** A

Expression and inhibition effects of hIL-10 in NIH3T3 cells on lymphocytes proliferation

WANG Xiao-ping, ZHAO Xiong-fei, YI Shao-xuan, CHEN Yu, TAI Guang-ping (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the inhibition effects of hIL-10 on graft rejection. **Methods** Retroviral vector carrying hIL-10 cDNA was successfully constructed, and introduced into package cell line PA317 through the liposome transfection (DOTAP) method. The pseudovirus producing cell clone was acquired by screening with G418. The pseudovirus was used to infect murine fibroblast cell NIH3T3. **Results** After screened, the NIH3T3 cells expressing hIL-10 were obtained. The expression of hIL-10 was detected by *in situ* hybridization and ELISA. The inhibition of hIL-10 to lymphocytes proliferation in MLC was determined with ^{3}H-TdR. **Conclusion** The supernatant of infected NIH3T3 cells were immunosupressive to MLR, suggesting that hIL-10 may serve as an ideal material for inhibiting immunoresponse in allograft transplantation.

Key words: interleukin-10; immunosupression; gene expression; NIH3T3

IL-10被称为细胞因子合成抑制因子(cytokine synthesis inhibiting factory, CSIF),由单核细胞和Th2细胞产生,能下调多种免疫反应[1],如能抑制Th1细胞的激活及降低巨噬细胞抗原提呈功能,抑制由Th1细胞分泌的细胞因子,尤其是IFN-γ[2],强烈地抑制单核细胞在抗原递呈中起重要作用的MHC Ⅱ类抗原的表达,还抑制单核细胞产生IL-12。

为了观察IL-10的免疫抑制作用,我们将构建好的pLXHIL-10载体,经包装细胞PA317包装后感染小鼠成纤维细胞株NIH3T3,用ELISA和原位杂交的方法检测hIL-10的表达,并对其生物学活性进行初步的观察。为进一步探索器官移植中的免疫基因治疗打下基础。

1 材料与方法

1.1 生物材料

hIL-10逆转录病毒表达载体pLXHIL-10(由作者构建,将在另文叙述),小鼠成纤维细胞NIH3T3、病毒包装细胞PA317从上海细胞研究所购买。

1.2 主要试剂

DOTAP脂质体转染试剂盒(GIBCO BRL),新霉素(G418)(GIBCO BRL),甘油(Sigma),细胞培养基DMEM(GIBCO BRL),小牛血清(华西医科大学医学分子生物研究室),大鼠抗hIL-10单克隆抗体(PHARMINGEN),胰蛋白酶1:250(Sigma),地高辛标记试剂盒(Boehringer Mannheim)。

1.3 细胞培养

参考文献[3],病毒包装细胞PA317和小鼠成纤维细胞NIH3T3均用含10%小牛血清的DMEM培养液培养,培养条件为37 ℃、5% CO_2,每2~3天以1:3~1:5传代1次。

1.4 脂质体(DOTAP)介导pLXHIL-10质粒转染PA317病毒包装细胞[4]

取生长状态良好,增殖活跃的PA317细胞,用胰蛋白酶和EDTA消化、计数,按每瓶5×10^5细胞接种于5 ml培养瓶,培养18~22 h,待细胞长至50%~80%融合时即可进行转染,转染过程按试剂盒说明书进行。37 ℃、5% CO_2 培养24 h。将细胞以1:10传代,接种于24孔培养板中,用含15%灭活小牛血清和600 μg/ml G418的DMEM培养液筛选,经G418筛选约2周后,抗性克隆长出。用自制的细吸管轻轻刮吸克隆中央细胞,接种

作者简介:汪小平(1968-),男,浙江省龙游县人,硕士,主治医师,讲师,主要从事烧伤临床方面的研究。电话:(023)68765495

收稿日期:2004-11-11;修回日期:2005-02-28

到 12 孔或 24 孔培养板上，每孔接种 1 个克隆的细胞。在 200 μg/ml G418 的选择压力下扩大培养。

1.5　病毒上清的收集和病毒滴度测定

PA317-HIL-10 包装细胞经克隆培养至 70% ~ 80% 融合，换无血清的 DMEM 培养液，继续培养 48 ~ 72 h，收集上清，1 000 r/min 离心 10 min，取上清 - 70 ℃保存备用，NIH3T3 细胞 3×10^4/孔接种于 24 孔培养板，24 h 后换新培养液 1 ml，同时加入 1 μl 病毒上清，37 ℃孵育 4 h，加入 1 ml 新鲜培养液继续培养 48 h；然后用 G418 (800 μg/ml)筛选培养，2 周左右出现抗性克隆。用无水乙醇固定，Giemsa 染液染色，计克隆数，算出病毒效价(以集落形成单位表示)：病毒效价(CFU/ml) = 平均每孔克隆数 × 上清稀释倍数

挑取上述抗性克隆扩大培养，以检测 hIL-10 的表达。

1.6　hIL-10 在鼠成纤维细胞 NIH3T3 中表达的检测

1.6.1　原位杂交法检测转染细胞中 hIL-10mRNA 的表达

按宝灵曼地高辛标记试剂盒说明书(随机引物法)标记 hIL-10 cDNA 探针。将 3T3 细胞用 0.02% 的胰蛋白酶和 0.02% 的 EDTA 消化后接种于载玻片上，贴壁培养 24 h→PBS 缓冲液液洗，37 ℃，5 min × 2 次→蛋白酶 K10 μg/ml，37 ℃，消化 5 min→加含标记探针和硅鱼精 DNA 的杂交液，42 ℃，杂交 12 ~ 16 h→用 buffer Ⅰ洗 5 min × 3 次→buffer Ⅱ孵化 1 h→buffer Ⅱ稀释的抗体(1:5 000)结合 30 min→buffer Ⅲ洗 15 min × 2 次→加显色液(45% NBT + 30% 磷酸盐，用 buffer Ⅲ稀释)显色 12h→加 buffer Ⅳ终止显色反应。

1.6.2　ELISA 法检测 IL-10　

将收集的 NIH3T3 培养上清用 PBS 缓冲液按 1:1 稀释加入酶联板上，每孔 200 μl，每个样本 2 个复孔，同时加 4 孔 PBS 作对照调零用。4 ℃放置 20 ~ 22 h→PBS 缓冲液洗 3 min × 3 次→PBS + 5% 小牛血清 37 ℃ 30 min→PBS 缓冲液洗 3 min × 3 次→PBS 缓冲液 + 5% 小牛血清 + hIL-10 单克隆抗体(1:1 000) 37 ℃ 30 min→PBS 缓冲液洗 3 min × 3 次→PBS 缓冲液 + 5% 小牛血清 + 酶标二抗(1:1 000) 37 ℃ 30 min→PBS 缓冲液洗 3 min × 3 次→加 BCIP 及 NBT 显色 10 min→每孔加 1 滴 2M H_2SO_4 终止显色反应→置酶标仪检测结果(波长 490 nm)。

1.7　hIL-10 对体外混合淋巴细胞培养反应(MLR)的抑制实验

常规分离 3 人(无血缘关系的两男一女或一男两女)外周血淋巴细胞(PBL)，均调浓度至 1×10^6/ml，作为反应细胞和刺激细胞。按每孔两种细胞各取 1×10^5，体积为 200 μl，设 pLXHIL-10 组(加 pLXHIL-10 感染的上清)和空载体 pLXSN 组(加 pLXSN 感染的上清)。每组按 0、1、10、100 μl 设 4 个浓度加入培养上清，每个浓度设 3 个复孔。37 ℃、5% CO_2、饱和湿度下培养 5 d，结束前 16 ~ 20 h 每孔加入氚标记胸腺嘧啶脱氧核苷(^{3}H-TdR) 1.0 μCi，37 ℃、5% CO_2、饱和湿度下继续培养。用塑料吸管将细胞收集于孔径 0.22 μm 的滤膜上，60 ℃烤箱中烤干，放入测量瓶中，加入 5 ml PPO/POPOP 闪烁液，用贝克曼液闪仪测其 1 min 吸光度值。结果以 3 复孔的平均吸光度表示。

1.8　统计学处理

进行 t 检验。

2　结果

2.1　脂质体介导 hIL-10 基因转染 PA317 细胞

根据脂质体转染试剂盒(Liposomal Transfection Reagent DOTAP)说明书操作，我们用 5×10^5 个细胞、5 μg DNA、30 μl DOTAP 转染 24 h，经 G418(800 μg/ml)筛选 2 周后，共得到 253 个抗性克隆，其转染率约为 0.506%。

2.2　PA317/pLXHIL-10 包装细胞病毒滴度测定

用脂质体(DOTAP)转染法将 pLXSN 和 pLXHIL-10 质粒分别导入病毒包装细胞 PA317 中，经 G418 进行筛选后形成多个抗性克隆细胞。从转染的细胞中各随机挑选 6 个克隆进行扩大培养，并收集细胞培养上清，分别测定这些细胞培养上清的病毒效价。结果见表 1。

表 1　不同抗性克隆病毒滴度的测定

Tab 1　Assay of titer of pseudovirus

Type	pLXSN(CFU/ml)	pLXHIL-10(CFU/ml)
1	2.38×10^5	4.35×10^5
2	0.65×10^5	1.43×10^5
3	1.85×10^5	0.05×10^5
4	5.54×10^5	0
5	0.07×10^5	6.76×10^5
6	4.58×10^5	0.47×10^5

根据效价最高的克隆计算出转染效率约为 1% 左右。

2.3　ELISA 检测转染 3T3 细胞上清中 hIL-10 的表达

加底物显色后肉眼可见加感染 3T3 细胞培养上清的各孔中均显示棕黄色，而对照孔和加未感染的 3T3 培养上清的各孔中均为无色。用酶联检测仪检测各孔的 D(490)值，见表 2。

表 2　ELISA 检测结果

Tab 2　The result of ELISA

Group	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.042	0.048	0.036	0.034	0.032	0.137	0.147	0.114	0.103	0.176	0.140	0.102
B	0.044	0.052	0.039	0.032	0.034	0.178	0.102	0.115	0.115	0.158	0.150	0.103

1: Control group; 2,3: No infected; 4,5: pLXSN infected; 6 - 12: pLXHIL-10 infected

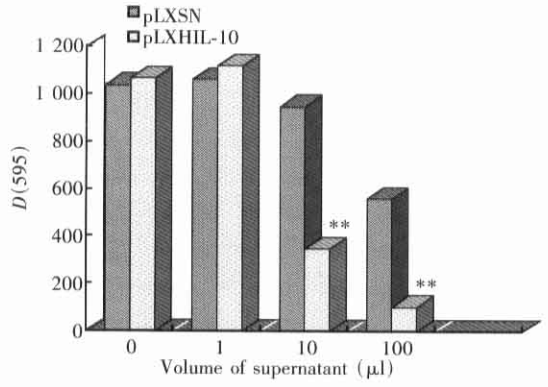
检测标本 D(490)值与阴性对照组 D(490)值的比值，未转染组和空载体组均小于 2，而含目的基因的感染上清组则均大于 2。以待测标本 D(490)值/阴性对照 D(490)值 > 2.1 为阳性。未感染组和空载为阴性，而含目的基因的感染组均为阳性。

2.4　原位杂交检测 hIL-10 mRNA 的表达结果

经用地高辛标记的 hIL-10 cDNA 探针对用 pLXHIL-10 的病毒上清和 pLXSN 病毒上清感染细胞分别进行原位杂交。结果用 pLXHIL-10 的病毒上清感染的细胞在细胞质中可见到很多呈紫蓝色的阳性颗粒；而对照组 pLXSN 病毒上清感染的细胞则呈阴性。

2.5　pLXHIL-10 感染细胞培养上清对体外淋巴细胞混合培养的抑制

在混合培养实验中，pLXHIL-10 感染细胞培养上清能明显抑制人外周血淋巴细胞活化增殖($P < 0.01$)，见图 1。



**：$P<0.01$，*vs* pLXSN

图1 感染 NIH3T3 细胞上清中 hIL-10 对 MLR 的抑制

Fig 1 The inhibition effect of hIL-10 in the supernatant of infected NIH3T3 cells on MLR

3 讨论

3.1 pLXHIL-10 逆转录病毒包装细胞的建立和病毒滴度测定

我们所使用的逆转录病毒表达载体 pLXSN 是 Miller 等在逆转录病毒载体 N2 基础上构建的新一代载体[5]。具有较高的安全性；经包装细胞包装后的成熟病毒感染率可达到 100%，整合率也较高；且载体具有一定的负载能力，插入的 DNA 片段可达到 7 kb。

为了将构建的逆转录病毒表达载体包装成具有感染能力的成熟病毒，我们将外源质粒 pLXHIL-10 用脂质体转入 PA317 细胞。其转染效率为 5.06×10^{-3}。

国外报道的病毒滴度一般为 10^6 CFU/ml，最高达 2×10^7，国内报道的病毒滴度一般为 $10^4\sim10^5$ CFU/ml。我们分别选取 pLXHIL-10 和 pLXSN 转染的 PA317 细胞 G418 抗性克隆各 6 个，分别收集克隆的培养上清，经感染 NIH3T3 细胞测定它们的病毒滴度为 $5\times10^3\sim6\times10^5$，与国内文献报道相一致。国外有文献报道先将逆转录病毒载体转染 Psi2 包装细胞后再用 PA317 进行再次包装（又称乒乓感染），可提高病毒滴度 10～100 倍[6]。另外，逆转录病毒载体 *gag* 基因或某些启动子的不完全缺失，也有利于提高逆转录病录的滴度[4]。其中有一个克隆滴度为 0，可能是在传代过程中，外源基因丢失或重组失活的结果。

3.2 逆转录病毒介导 hIL-10 基因转染小鼠成纤维细胞 NIH3T3 及其在 NIH3T3 中的表达

逆转录病毒载体是目前最常用，转染效率最高的载体之一，尤其适用于 *ex vivo* 基因治疗。用间接 ELISA 法检测到被感染的 3T3 细胞培养上清中有 hIL-10 的表达，而作为对照的未被感染的 3T3 细胞培养上清中则未检测到 hIL-10 的表达。证明了我们构建的 pLXHIL-10 是成功的。

用地高辛标记 hIL-10 cDNA 探针对被感染的 3T3 细胞进行原位杂交，也证明被感染的 3T3 细胞的细胞质中有大量的 hIL-10 的 mRNA 表达；而作为对照的未被感染的 3T3 细胞中则没有 hIL-10 的 mRNA 表达。进一步证实了 pLXHIL-10 的构建是成功的。

3.3 hIL-10 体外抑制混合淋巴细胞的增殖反应

混合淋巴细胞培养（MLC）是研究两个遗传型不同的个体之间淋巴细胞表面的组织相容性抗原差异程度，以及淋巴细胞对同种异体细胞的反应能力的技术，为研究细胞免疫的主要参数之一。将两个遗传型不同的个体之淋巴细胞在体外混合共同培养时，因其表面的组织相容性抗原不同而相互刺激，而导致对方淋巴细胞分裂增殖，这种反应称为混合淋巴细胞反应（MLR）。

IL-10 是一种具有免疫下调作用的细胞因子，能负性调控多种免疫反应。如能抑制 Th1 细胞的激活及降低巨噬细胞抗原提呈功能，在器官移植中可减少抗原特异性淋巴细胞的产生。抑制由 Th1 细胞分泌的细胞因子，尤其是 IFN-γ。能强烈地抑制单核细胞在抗原递呈中起重要作用的 MHC II 类抗原的表达，还抑制单核细胞产生 IL-12。

实验结果提示 3T3 细胞培养上清中的 hIL-10 在体外明显抑制 MLR。在一定程度上说明了 hIL-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，并为进一步研究以 hIL-10 为目的基因，以成纤维细胞为中介细胞的基因治疗，在异体皮肤移植物的局部发挥免疫抑制作用，从而避免全身应用免疫抑制剂所产生的毒副作用，对于器官移植的局部抗排斥治疗可能有重要的意义。

参考文献：

[1] de Waal Malefyt R, Haanen 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(5): 915－924.

[2] Willems F, Marchant A, Delville J P, *et al*. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes[J]. Eur J Immunol, 1994, 24(4): 1007－1009.

[3] 鄂 征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京：北京出版社，1995. 200－250.

[4] Gelinas R, Novak U. Retroviral vectors for the β-globin gene demonstrate improved titer and expression[J]. Ann N Y Acad Sci, 1990, 612: 427－441.

[5] Zhu M, Wei M F, Liu F, *et al*. Interleukin-10 modified dendritic cells induce allo-hyporesponsiveness and prolong small intestine allograft survival [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(11): 2509－2512.

[6] Kotani H, Newton P B 3 rd, Zhang S, *et al*. Improved methods of retroniral vector transduction and production for gene thetapy[J]. Hum Gene Ther, 1994, 5(1): 19－28.

（编辑 薛国文）