DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.057
第23卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 2
2001年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2001

文章编号:1000-5404(2001)02-0241-03

技术方法

重组白细胞介素10-pEGFP-N2质粒构建及表达

Construction and expression of a pEGFP-N2-IL-10 recombinant plasmid

程远雄,钟南山 (广州呼吸病研究所,广州 510120)

提 要:目的 将IL-10基因定向克隆入pEGFP-N2质粒,探讨采用构建的质粒转染支气管上皮细胞H292株,稳定表达IL-10和荧光蛋白可行性。方法 采用定向克隆技术,将IL-10基因克隆入pEGFP-N2质粒,用构建成功的IL-10-pEGFP-N2质粒在Fuge-6介导下转染培养的支气管上皮细胞株(H292),利用免疫组化、RT-PCR检测细胞中IL-10蛋白和mRNA的表达,并在荧光显微镜下观察荧光蛋白表达。结果 ①重组后的pEGFP-N2质粒已成功载入IL-10基因。②IL-10-pEGFP-N2质粒转染支气管上皮细胞H292株后,可在H292株内表达IL-10mRNA、IL-10蛋白和荧光蛋白。结论 重组的IL-10-pEGFP-N2质粒可在上皮细胞内表达IL-10和荧光蛋白。由于两者共用一个启动子,荧光蛋白表达可报告IL-10表达,适用于动物实验气道内的IL-10转基因研究。

IL-10是1989年美国DNAX研究所Fiorentino等[1]发现的一种细胞因子合成抑制因子,具有广泛免疫抑制作用,目前多用于自身免疫疾病治疗的研究[2,3]。本研究利用pEGFP-N2质粒带有荧光蛋白序列为报告基因的特点,将IL-10基因定向克隆入pEGFP-N2质粒,探讨利用该质粒转染支气管上皮细胞H292株,稳定表达IL-10基因和荧光蛋白可行性,为动物体内IL-10转基因治疗,以荧光蛋白为报告基因分析转基因的效率、IL-10基因表达分布部位和表达动力学奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株和质粒

H292细胞株(支气管上皮细胞株由英国南安普敦大学呼吸病研究所惠赠),细胞培养常规用10%FCS的DMEM培养基于37℃,5%CO_2孵箱培养。

载有hIL-10基因的pCDSRα质粒(pCDSRα-IL-10)由英国国立心肺研究所孙英博士惠赠,pEGFP-N2质粒由英国南安普敦大学呼吸病研究所惠赠。

1.2 主要试剂及试剂盒

Fuge-6脂质体转染试剂盒(GENE公司产品),免疫组化试剂(DAKO公司产品),hIL-10抗体(H-16)(Santa Cruz公司产品)。*Hind*Ⅲ、*BamH*Ⅰ等(均购自Promega公司)。

1.3 构建载有IL-10基因的pEGFP-N2质粒

按载体的要求,扩增的hIL-10含启动的编码序列,无读码框内终止信号,全长为535 bp。为方便将PCR产物装入pEGFP-N2载体中,在上游引物5′端加上酶切位点*Hind*Ⅲ,在下游引物5′端装上*BamH*Ⅰ的酶切序列共14 bp,经计算机模拟分析,引物自身不会互补或形成发夹结构。所用IL-10引物由上海申工生物工程公司合成。

上游引物:5′ AAGCTTCATGCACAGCTCAGCACTG 3′

下游引物:5′ GGATCCAGTTTCGTATCTTCATT 3′

可扩增出1条547 bp的cDNA片断,反应条件为:94℃ 1 min,56℃ 1 min,72℃ 1 min,共30个循环,延伸72℃ 10 min,最后4℃恒温维持。将扩增的IL-10 cDNA片断与TE载体连接,双酶切后定向克隆入pEGFP-N2质粒中,构建的质粒命名为IL-10-pEGFP-N2。

1.4 支气管上皮细胞株转染及转染效率检测

将培养的H292细胞按2×10^5/孔接种24孔板,培养24 h,待细胞达50%~75%,按试剂盒说明书步骤混匀质粒、fuge-6、无血清无抗生素培养基(2μg∶6μl∶100μl/孔),加入换液后的培养细胞中,转染后以12 h为时间段,在倒置荧光显微镜下记数不同时间段6个视野内发绿色荧光的细胞和该视野的全部细胞比率的均值作为该时段的细胞转染率。根据转染的质粒不同和实验需要分为pEGFP-N2组、IL-10-pEGFP-N2组、pCDSRα-IL-10组、空白对照组,每组5个样本。

1.5 转染细胞株中IL-10表达的免疫组化检测

取转染48 h的H292细胞用PBS冲洗后,用兔抗人的IL-10抗体进行免疫组化染色(S-P法)。所有石蜡切片均经微波抗原修复15 min。

1.6 转染细胞株中IL-10表达的RT-PCR检测

参照文献[7]方法进行。

2 结果

2.1 载有IL-10的pEGFP-N2质粒构建结果鉴定

重组IL-10-pEGFP-N2质粒的鉴定结果见图1。

2.2 转染的H292细胞株hIL-10 mRNA的检测

取转染48 h后H292细胞,提取总mRNA行RT-PCR检测,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析显示:pCDSRα-IL10质粒和IL-10-pEGFP-N2质粒均有IL-10 mRNA表达,而阴性对照组(pEGFP-N2质粒转染组)、空白对照组均无hIL-10 mRNA表达,见图2。

2.3 转染的H292细胞株免疫组化结果分析

pCDSRαIL-10和IL-10-pEGFP-N2转染后的H292细胞株中有不等数量的细胞表达IL-10,在光镜下观察呈棕色,而阴性对照组pEGFP-N2组则未见有IL-10表达,见图3~5。

2.4 转染的H292细胞株荧光蛋白表达观察

在荧光显微镜下可观察到12 h pEGFP-N2和IL-10-pEGFP-

基金项目:广州市科技进步基金重点资助项目(穗科基1998-11)
作者简介:程远雄(1964-),男,湖北省武汉市人,博士,主治医师,主要从事支气管哮喘气道炎症的分子机制方面的研究,发表论文20余篇,现在第一军医大学南方医院呼吸内科,广州 510510。电话:(020)85141575
收稿日期:2000-07-05;修回日期:2000-12-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

N2 转染的 H292 的细胞株中已有荧光蛋白表达，在波长为 500 μm 紫外光激发下呈绿色，48 h 表达到高峰，转染后第 8 天仍有表达，二组表达动态基本一致。而空白组及 pCDSRα-IL10 转染组则无绿色荧光表达。pEGFP-N2 转染率最高为 22%，而 IL-10-pEGFP-N2 最高转染率仅为 10%，见图 6，7。

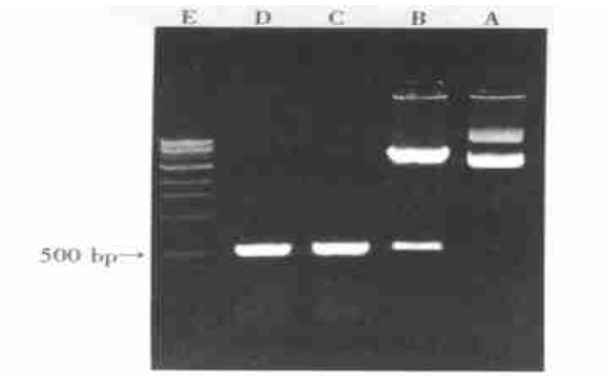


图 1 重组 **IL-10-pEGFP-N2** 质粒的鉴定
A：IL-10-pEGFP-N2 质粒；B：IL-10-pEGFP-N2 经 *Hind* Ⅲ和 *BamH* Ⅰ酶切产物；C：IL-10-pEGFP-N2 PCR 扩增产物；D：pCDSRα-IL-10 PCR 扩增产物；E：1 000 bp 阶梯碱基参照带

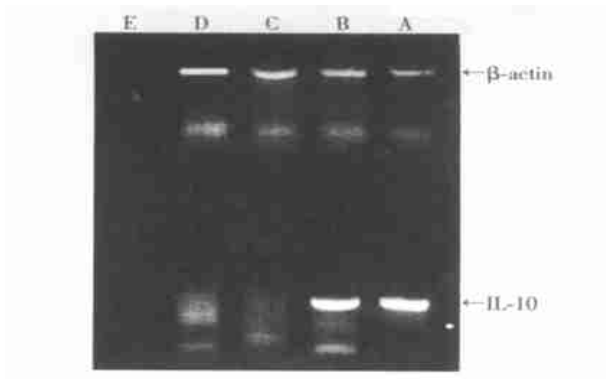


图 2 **H292** 细胞株转染后 **IL-10 mRNA** 表达的 **PCR** 检测
A：pCDSRα-IL-10 质粒转染组；B：IL-10-pEGFP-N2 质粒转染组；C：pEGFP-N2 质粒转染组；D：对照组；E：100 bp 阶梯碱基参照带

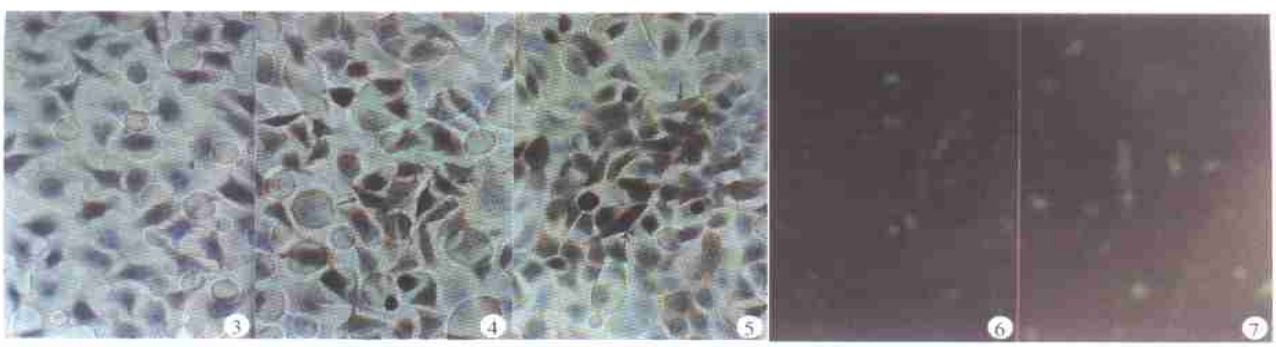


图 3 支气管上皮细胞株 **H292** 转染 **pEGFP-N2** 质粒后 **IL-10** 免疫组化结果 （ICC/S-P× 400）
图 4 气管上皮细胞株 **H292** 转染 **IL-10-pEGFP-N2** 质粒后 **IL-10** 免疫组化结果 （ICC/S-P× 400）
图 5 支气管上皮细胞株 **H292** 转染 **pCDSRα-IL-10** 质粒后 **IL-10** 免疫组化结果 （ICC/S-P× 400）
图 6 转基因后观察 **pEGFP-N2** 细胞株中荧光蛋白表达 （荧光蛋白×200）
图 7 支气管上皮细胞株 **H292** 转染 **IL-10-pEGFP-N2** 质粒后荧光蛋白表达 （荧光蛋白×200）

3 讨论

IL-10 在体内代谢较快，半衰期较短，仅为 2.5 h，局部及静脉给药均较难在肺部维持稳定浓度[4]，如果能通过转基因增加 IL-10 在肺组织稳定表达，则可更好的发挥其抑炎作用。肺组织是一个开放性器官，吸入糖皮质激素疗法已在支气管哮喘治疗中取得较消化道和静脉给药更为理想的疗效，经气道转基因疗法势必成为肺组织弥漫性疾病治疗一个重要手段。

pEGFP-N2 是一个较为成功的商业化能表达荧光蛋白的质粒，它编码一种变异野生型 GFP 变异体，该蛋白具有荧光更明亮及在哺乳细胞内表达更高的特点，它要求克隆到 pEGFP-N2 中的目的基因，应与 GFP 具有相同的读码框，并无读码框内终止信号，编入的基因还应包括启动的 ATG 序列，最终产物为目的基因所表达蛋白与荧光蛋白的融合体，一般情况下不会影响目的基因表达产物的生物活性[5]。pEGFP-N2 质粒目前主要用于判定转基因的效率和目的基因定位，以及目的基因表达与功能关系的研究[6]。

IL-10 在实验动物体内或接受治疗的人体内均有不同程度的表达，在转基因的研究中较难分辨 IL-10 是转基因表达的，还是研究对象受实验方法影响而表达增加，另外研究者也希望能准确了解转基因后外源的 IL-10 表达分布部位、组织和表达的效率。本研究构建的 IL-10 pEGFP-N2 质粒可在不表达 IL-10 的上皮细胞株 H292 中表达荧光蛋白和 IL-10，由于二者共用一个启动序列且 IL-10 编码基因据于上游，因而荧光蛋白的表达与 IL-10 的表达，且易于观察定位、定量，为动物气道内 IL-10 转基因研究提供了一个理想的质粒。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

关键词：白细胞介素 10；转基因；支气管上皮细胞株 H292；荧光蛋白
中图法分类号：R392.2　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Fiorentino D F, Bond M W, Mosmann T R, *et al*. Two types of mouse helper T cell. Ⅳ. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones[J]. J Exp Med, 1989, 170(6): 2 081—2 095.
[2] Wogensen L, Lee M S, Sarvetnick N J. Production of interleukin 10 by islet cells accelerates immune-mediated destruction of beta cells in nonobese diabetic mice[J]. Exp Med, 1994, 179(4): 1 379—1 384.
[3] Prete G D, Almerigogna F, Giudizi M G, *et al*. Human IL-10 is produced by both type 1 helper(Th1) and type 2 helper(Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production[J]. J Immunol, 1993, 150(2): 353—360.
[4] Moore K W, O' Garra A, de-waal-Malefyt R, *et al*. Interleukin-10[J]. Annu Rev Immunol, 1993, 11(1): 165—169.
[5] 何琪杨，张鸿卿，薛绍白. 活细胞的分子探针-绿色荧光蛋白[J]. 国外医学：分子生物学分册，1997，19(6)：279—283.
[6] Higashijima S, Okamoto H, Ueno N, *et al*. High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin[J]. Dev Biol, 1997, 192(2): 289—299.
[7] 程远雄，钟南山，徐　军，等. 人白细胞介素-10 在支气管上皮细胞株 H292 中的表达及生物活性鉴定[J]. 第三军医大学学报，2000，22(9)：853—856.

（编辑　王　红）

文章编号：1000-5404(2001)02-0243-01

经验与短篇

纤维喉镜下小儿声带息肉、小结摘除术 100 例

Resection of vocal fold polyps and noduli in 100 children under laryngeal fibroendoscope

刘庆顺，孟祥贵　（第三军医大学附属新桥医院耳鼻咽喉科，重庆 400037）

我科自 1992 年 3 月至 2000 年 3 月使用日产 Olympus ENF-T3 型纤维喉镜检查喉部共 12 000 例，其中对小儿声带息肉、小结行手术摘除 100 例，收到良好的效果，报告如下。

1　资料与方法

临床资料：本组 100 例手术病例中，男性 38 例，女性 62 例，年龄 8～13 岁；其中声带息肉 32 例，声带小结 68 例。病程 1～5 年。

手术方法：麻醉采用 1% 地卡因液喷雾鼻腔及喉腔粘膜表面麻醉，鼻腔内采用 2% 麻黄素液喷雾鼻腔。麻醉成功后，患儿取坐位。令助手固定患儿头部，保持正确的姿势。术者将纤维喉镜镜体远端由宽大侧之鼻腔伸达喉部，窥清声门后，将镜头对准手术部位。将该镜匹配的活检钳沿活检孔缓慢推进到手术部位，活检钳插入深度以能张开钳口两叶为宜。根据病变的部位转动镜体及调节角度，使其既能详细观察病变部位又利于声带息肉或小结的摘除。看清声带息肉、小结，令助手张开钳叶，使其活动平面与声带边缘呈 15°～45°角或平行。使息肉或小结位于两钳叶之间，令助手收紧活检钳后端的活塞，使其所钳声带息肉或小结全部或大部分组织钳紧，防止脱落，术者持活检钳钳体沿活检孔缓慢退出。如遇有残留可分次钳除，直至声带边缘光滑、平整。本组病例 1 次钳除者 86 例，2 次钳除者 11 例，3 次钳除者 3 例。术后按喉部术后常规用药，适当禁声。对所钳组织术后均行病理检查并证实为声带息肉或声带小结。

2　结果

近期疗效分级评定：治愈：1 周内声音恢复正常，显效：声嘶明显改善；有效：声嘶改善，无效：声嘶无变化[1]。本组治愈 32 例，显效 51 例，有效 17 例。治愈率为 32%，总有效率为 100%；无一例出现并发症。

3　讨论

纤维喉镜下行声带息肉、小结摘除术，较之支撑喉镜下手术具有操作简单、不需住院，又免去了全麻之虞。手术时间短，89 例患儿可在 5～10 min 之内一次性完成。安全性高，作者体会纤维喉镜视野广，照明度强，镜体细小，弯曲性好，角度变化灵活，近距离具有放大作用，可以仔细观察病变部位并准确地钳取声带息肉或小结。加之活检钳钳口小（钳口末端张开时最大直经为 5 mm），不会损伤声带肌层组织和过度损伤声带固有层。对声带固有层的任何外科操作都能影响声带的振动特性。Hochman 强调用上皮性声带切除技术，切除声带病变，能最小限度地影响声带的固有层和上皮，快速地恢复声带功能[2]。我们在纤维喉镜下行声带息肉、小结摘除术，符合上皮性声带切除术的要求。对于双侧对称性声带息肉或小结应分次钳除，以免声带粘连[3]。

关键词：声带小结；声带息肉；纤维喉镜；外科手术
中图法分类号：R767.91　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 吴　波，林尚泽. 纤维喉镜下行声带息肉、小结切除术[J]. 临床耳鼻喉科杂志，1998，12(7)：329—330.
[2] Hochman I I, Zeitels S M. Phonomicrosurgical management of vocal fold polyps: The subepithelial microflap resection technique[J]. J Voice, 2000, 14(1): 112—118.
[3] 黄　健. 纤维喉镜下射频治疗喉部增生性病变[J]. 临床耳鼻喉科杂志，1998，12(6)：286.

（编辑　王　红）

作者简介：刘庆顺(1955—)，男，吉林省辉南县人，主管技师，主要从事听力学及纤维喉镜检查方面的研究，发表论文 18 篇。电话：(023)68755419

收稿日期：2000-04-03；修回日期：2000-09-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net