DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.09.016
第22卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 9
2000年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2000

文章编号:1000-5404(2000)09-0853-04

论著

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

程远雄,钟南山,徐 军,赖克方 (广州呼吸疾病研究所,广州 510120)

提 要:目的 探讨在支气管上皮细胞H292株(H292)中表达人白细胞介素10(hIL-10),并鉴定其生物活性。方法 将载有hIL-10基因的pcDSRα质粒(pcDSRα-IL-10),经脂质体Fuge-6介导转染H292株。应用逆转录聚合酶反应(RT)及聚合酶链式反应(PCR),检测转染后48 h H292株中IL-10 mRNA的表达;用ELISA法测定hIL-10在不同时段H292培养上清液中的表达的量;分析hIL-10对LPS诱导T淋巴细胞IFN-γ分泌的抑制作用。结果 RT-PCR检测显示转染后的H292中有hIL-10 mRNA表达,未转染的H292则未能检测到其mRNA表达。ELISA检测转染后H292上清液中24 h已有hIL-10表达,48 h达高峰,以后逐渐下降,未转染组上清液则无IL-10表达。表达的hIL-10与标准hIL-10对LPS诱导的IFN-γ分泌抑制作用差别不显著($P>0.05$),均显著强于未转染组($P<0.01$)。结论 重组的hIL-10 pcDSRα质粒可成功在H292中表达hIL-10,表达的hIL-10有理想的生物活性,可用于体内转基因研究。

关键词:白细胞介素10(IL-10);转基因;支气管上皮细胞株H292;pcDSRα质粒
中图法分类号:R322.34;R329.23 文献标识码:A

Expression and biological activity of human interleukin-10 in human bronchial epithelial cell line H292

CHENG Yuan-xiong, ZHONG Nan-shan, XU Jun, LAI Ke-fang (Guangzhou Research Institute of Respiratory Diseases, Guangzhou 510120, China)

Abstract: Objective To explore the expression and biological epithelial activity of human interleukn-10 (hIL-10) in human bronchial epithelial cell line H292. Methods Plasmid pcDSR α containing hIL-10 gene (pcPSR α-IL-10) was transfected into H292 with lipofectin Fuge-6. The expression of IL-10 mRNA in H292 cells was identified with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 48 h after the transfection and its quantity of expression was detected with ELISA in the supernatant of H292 culture medium at different time points. Inhibitory effect of expressed IL-10 on the secretion of IFN-γ by LPS induced T cells was compared with that of expressed standard hIL-10 (shIL-10) of the supernatant of untransfected H292. Results hIL-10 mRNA was detected by PCR in the transfected H292 but not in untransfected H292. With ELISA, the expression of hIL-10 in the supernatant of transfected H292 began at 24 h, reached to the peak at 48 h, and then slowly went down, but no was in the supernatant of the untransfected H292. No difference of inhibitory effect on IFN-γ secretion was found between hIL-10 and shIL-10, which were more effective than the supernatant of untransfected H292 ($P<0.01$). Conclusion hIL-10 can be successfully expressed in H292 by transferring with pcDSR γ-hIL-10 with same biological activity as shIL-10 and can be used in transgenic application.

Key words: interleukin-10; transgene; bronchial epithelial cell line H292; pcDSRα plasmid

IL-10是1989年美国DNAX研究所Fiorenino等[1]发现的一种细胞因子合成抑制因子,研究发现IL-10不仅可抑制Th0、Th1、Th2细胞分泌的细胞因子,还可抑制巨噬细胞、T细胞和NK细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞多种炎性细胞的功能,IL-10对IFN-γ、IL-13、IL-4

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,博士研究生,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。电话:(020)85147113
收稿日期:2000-03-25;修回日期:2000-07-11

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

诱导的单核细胞/巨噬细胞膜表面蛋白 MHC Ⅱ、ICAM-1、B7.1(CD80)、B7.20(CD86)表达有较强的抑制作用。目前认为 IL-10 可抑制自身免疫炎症过程中抗原提呈、炎性细胞激活和细胞因子分泌等环节,具有较强的免疫抑制作用,在自身免疫疾病治疗领域有较好的应用前景[2]。本研究旨在探讨在支气管上皮细胞 H292 株中表达重组的 hIL-10 并鉴定其生物活性,为研究 IL-10 转基因治疗奠定基础。

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桑普顿呼吸病研究所惠赠),细胞培养常规用 10% FCS 的 DMEM 培养基于 37 ℃, 5% CO_2 孵箱培养。载有可表达 hIL-10 的真核高效表达质粒 pcDSRα 由英国国立心肺研究所孙英博士惠赠。

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),RT 试剂盒,PCR 试剂盒(PROMIGA 公司产品),hIL-10、IFN-γ 检测 ELISA 试剂盒(晶美公司产品),标准 hIL-10(shIL-10)、LPS 购自 R&D 公司。

1.3 培养细胞的转染

将培养的 H292 细胞按 2×10^5 接种 24 孔板,培养 24 h,待细胞达 50%~75%,按试剂盒说明书步骤每孔混匀质粒(2 μg)、Fuge-6(6 μl)、无血清无抗生素培养基(100 μl),加入换液后的培养细胞中,转染后 24、36、48、72、96 h 收集培养上清液和细胞,收集 24 h 前 PBS 洗涤细胞后改为无血清培养基培养,未转染组为对照组。

1.4 目的基因 hIL-10 在 H292 细胞表达的检测

1.4.1 目的基因 hIL-10 在 H292 细胞中转录的检测 按《分子克隆》总 RNA 提取步骤提取转染 48 h 和未转染组传代后 24、72 h 细胞的总 RNA,取 80 μg 总 RNA 按 RT、PCR 试剂盒说明分别进行 RT 和 PCR,IL-10 引物或β-actin 引物由上海生工生物工程公司合成。

所用 IL-10 引物为:

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,加强延伸 72 ℃ 10 min,最后 4 ℃保温。

所用β-actin 引物为:

上游引物:5′ ATCTGACACCACACCTTCTACAATGAGCTGCTG 3′;

下游引物:5′ CGTCATACTCCTGCTTGCTTGCTGATCCACATC-TG 3′;

可扩增出 1 条 838 bp 的 cDNA 片断,反应条件为:94 ℃ 1 min,59 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,共 35 个循环,加强延伸 72 ℃ 10 min,最后 4 ℃保温。结果重复 5 次,采用凝胶电泳分析。

1.4.2 目的基因 hIL-10 在 H292 株中表达的检测 按照 ELISA 试剂盒提供的方法检测培养上清液中表达 hIL-10 的量。

1.5 H292 细胞株中表达的 IL-10 生物活性鉴定

收集 48 h 的 hIL-10 转染的 H292 细胞株的培养上清液,冻干后用双蒸水重溶,将 hIL-10 浓度调整为 10 μg/μl,对照组上清液按相同的比例浓缩、稀释。梯度离心法分离正常人的淋巴细胞,常规用 10%FCS 的 DMEM 培养基,37 ℃、5% CO_2 培养,每孔 1×10^6 淋巴细胞,分组加入 10 μg LPS 和不同浓度的 shIL-10、hIL-10 和相应稀释比例的对照组重溶上清液,培养 48 h 收集培养上清液,用 ELISA 法测量上清液中 IFN-γ 的表达。

1.6 统计学处理

采用 Excel 软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 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 作 RT-PCR,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析显示载有 hIL-10 的 pcDSRα 质粒有 IL-10 mRNA 表达,而对照组 H292 在传代后 24 h(Control 1)、72 h(Control 2)均无 hIL-10 mRNA 表达,见图 1。

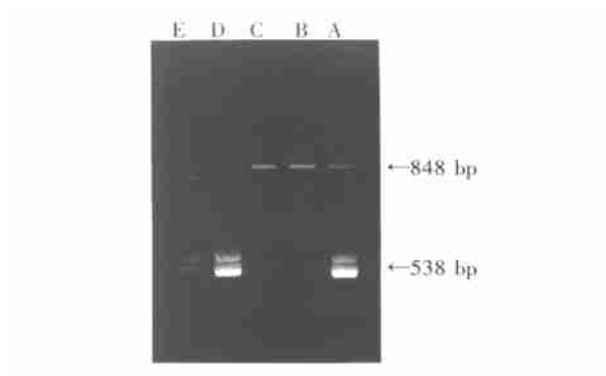


图 1 RT-PCR 分析 hIL-10pcDSRα 质粒转染 H292 后 IL-10 mRNA 的表达

Fig 1 RT-PCR analysis of the expression of IL-10 mRNA in H292 transferred hIL-10pcDSRα

Lane A: Cell lines transfected by pcDSRα-IL-10 plasmid; Lane B: Control 1; Lane C: Control 2; Lane D: pcDSRα-IL-10 plasmid; Lane E: 100 bp ladder

2.2 培养的 H292 细胞株中 hIL-10 的表达动态

ELISA 检测显示 hIL-10 基因在转染 H292 细胞株上清液中 24 h 已有表达(147 pg/ml),表达高峰在 48 h(489 pg/ml),然后逐渐下降,96 h 仍有表达,见表 1。对照组上清液于 48、96 h 有微量 IL-10 表达,余各时相均未见 hIL-10 表达。

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

表 1　hIL-10 在转染后 H292 细胞株中表达动态 (ρ_B/pg·ml^{-1}, $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Tab 1　Kinetics of hIL-10 expression in transfected H292 cell line (ρ_B/pg·ml^{-1}, $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

t/h	Transfected H292	Control
24	147.0±24.2	0
36	323.0±59.7	0
48	489.0±167.5	5.3±1.4
72	368.0±129.5	0
96	247.0±52.9	2.7±1.6

2.3　转染后H292 细胞株中表达的hIL-10 生物活性鉴定

转染后H292 细胞株中表达的 hIL-10 可显著抑制 LPS 诱导的T 淋巴细胞 IFN-γ 的分泌, 与 shIL-10 作用差异无显著性, 对照组 H292 上清液无类似抑制作用, 结果显示转基因表达的 hIL-10 有较好生物活性, 见表 2。

表2　hIL-10 对 LPS 诱导的 T 淋巴细胞 IFN-γ 分泌的抑制作用(ρ_B/pg·ml^{-1}, $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Tab 2　Inhibiting effect of expressed IL-10 on IFN-γ secretion by LPS stimulated T cells(ρ_B/pg·ml^{-1}, $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

IL-10(ρ_B/ng·ml^{-1})	hIL-10	shIL-10	Control
0	2 753.0±287.6	2 543.0±318.4	2 647.0±276.8
0.1	2 247.0±279.1 *	2 159.0±212.5 **	2 550.4±309.4
0.5	1 852.6±257.2 **	1 792.6±277.8 **	2 580.0±245.6
1.0	1 303.5±219.8 **	1 104.3±299.8 **	2 620.6±335.7

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* shIL-10

3　讨论

肺部 IL-10 相对或绝对分泌不足被认为是支气管哮喘和其它肺部自身免疫性疾病发病的一个易患或易加重的因素。1996 年 Borish 等[3] 观察发现哮喘患者支气管肺泡灌洗液(BAL)IL-10 的浓度及其 mRNA 表达均低于正常人, 且外周血中单核细胞(PBMC)不论刺激与否 IL-10 表达均低于正常人。而经皮质类固醇激素和氨茶碱治疗, 哮喘症状逐步控制的患者体内 IL-10 表达增加, 皮质激素和氨茶碱治疗哮喘至少部分是经过提高 IL-10 在肺组织表达而发挥治疗作用的[4,5]。支气管哮喘主要表现为与自身免疫功能异常密切相关的气道慢性炎症, 抗炎治疗已成为根本的治疗措施。IL-10 有希望成为新的支气管哮喘其它自身免疫性疾病的治疗药物。但 IL-10 在体内半衰期较短仅为 2.5 h, 代谢较快, 静脉给药较难在肺部维持稳定浓度, 这也是限制 IL-10 在肺部应用的一个因素。

自 1983 年开展首例转基因治疗的研究以来, 到目前为止尚无转基因治疗成功的报道。限制转基因治疗应用还有一系列待解决的难题, 如载体的免疫原性、转基因的靶向性较难控制、转基因的效率较低等。肺部是一个开放性器官, 就弥漫性肺部炎症转基因治疗而言, 较易解决靶向性问题。pcD 质粒是由 Okayama 等[6] 构建, 用于克隆 cDNA 片断。1988 年 Yutaka 等[7] 插入 SR-α 启动片断, 构建的 pcDSRα 可在多种真核细胞高效表达 cDNA 片断, 尤其是细胞因子, Moore 等[8] 将 IL-10 基因克隆到该质粒中用电穿孔法转染 COS7 细胞, 将转染细胞上清液加入 PHA 刺激的 PBMC 中, 观察 IFN-γ 的抑制率, 比较不同来源 IL-10 的生物活性。我们的体外研究结果提示载有 IL-10 的pcDSRα 质粒经脂质体 Fuge-6 介导, 可在 H292 细胞株中表达 hIL-10, 24 h 即有表达, 48 h 达到峰值, 延续至 96 h 仍有表达, 表达的量较为稳定, 对照组在 48、96 h 有微量 IL-10 表达, 不能排除 ELISA 试剂盒测量的误差所至。转染后48 h 在转染组可用 RT-PCR 的方法检测出 hIL-10 mRNA的表达而对照组于传代后 48 h(相当于转染前), 96 h(与转染后时相一致)均未能测出(结果重复 5 次)。结果充分证明我们已成功转染 H292 株。IL-10 有多向免疫抑制活性, 比较稳定的生物活性是抑制 LPS 诱导 PBMC 的 IFN-γ 的分泌, Vieira 等[9] 在 IL-10 ELISA 试剂盒问世前多采用该方法判断 IL-10 的量和生物活性。本研究采用该方法与 shIL-10 对比评估 H292 细胞株, 转基因后表达的 hIL-10 生物活性, 结果提示: 在同一浓度 hIL-10 和 shIL-10 生物活性无显著差别, 均可显著抑制 LPS 诱导的 T 淋巴细胞 IFN-γ 分泌, 对照组细胞培养上清液无该作用。

本研究说明载有 IL-10 的pcDSRα 质粒可在转染的支气管上皮细胞株 H292 中稳定的表达, 表达的 IL-10 具有较好的生物活性, 可用于体内转基因治疗研究。

参考文献:

[1] Fiorentino D F, Bond M W, Mosmann T R. 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] Moore K W, O'Garra A, Malefyt Rene de W, *et al*. Interleukin-10[J]. Annu Rev Immunol, 1993, 11: 165—190.

[3] Borish L, Aarons A, Rumbyrt J, *et al*. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma[J]. Allergy Clin Immunol, 1996, 97(6): 1 288—1 296.

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

[4] John M, Lim S, Seybold J, *et al*. Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1 alpha, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma release from alveolar macrophages in asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 157(1): 256—262.

[5] Mascali J J, Cvietusa P, Negri J. Anti-inflammatory effects of theophylline: Modulation of cytokine production[J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 1996, 77(1): 34—38.

[6] Okayama H, Berg P. A cDNA cloning vector that permit expression of cDNA inserts in mammalian cells[J]. Mol Cell Biol, 1983, 3(2): 280—289.

[7] Takebe Y, Seiki M, Fujisawa J. SRα promoter: An efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat[J]. Mol Cell Biol, 1988, 8(1): 466—472.

[8] Moore K W, Vieira P, Fiorentino P D, *et al*. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRFI[J]. Science, 1990, 248(4 960): 1 230—1 234.

[9] Vieira P, de-Waal-Malefyt R, Dang M N, *et al*. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: Homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRFI[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(4): 1 172—1 176.

(编辑 王 红)

(上接852页)

生素、微量元素，其中蛋白占总热量25%、糖占63%、脂肪为12%，每100 g含1 925 kJ(460 kcal)。

1.3 喂养时间及剂量

入院后无休克征象者即可开始喂养，早期采用鼻饲，首次予奥力康30 g+水50 ml，间隔2 h，患者无不适，抽吸营养管无潴留时，可逐渐加大用量至50 g+水80 ml。患者能主动进食后，改为口服，根据病人饮食情况于每日3餐间隙加喂3次奥力康，并在患者睡前再喂1次，每次剂量50 g。

1.4 临床监测指标

1.4.1 体重 病人入院后即称体重，第1周每日称重，以后每周1次直至出院。

1.4.2 三头肌皮皱及上臂周径 三头肌皮皱：使用国家体委体育科学研究所生产的皮脂厚度计测量，皮皱数用mm表示。上臂周径：选择病人左或右上臂(每次应测同一部位)，于肩峰和鹰嘴连线中点用皮卷尺测量，即为上臂周径，用cm表示。

1.4.3 血清白蛋白及球蛋白 采用常规生化法由我院检验科测定。

1.4.4 氮平衡 根据医嘱和护理记录计算每日实际供给的总氮量。收集24小时尿量，测定每日尿氮排出量。创面失氮以尿氮量1/3计算[2]。

1.5 统计学分析

所有数据采用 t 检验。

2 结果

伤后第1、2周血清白蛋白及球蛋白变化不大，均在正常范围内，第3周开始白蛋白增高，维持在较高水平，球蛋白第2~4周约低于正常水平，见表1。

伤后1~4周呈负氮平衡，到第6周呈正氮平衡，见表2。

体重、上臂周径及三头肌皮皱下降不明显。

表1 血清白蛋白、球蛋白变化情况(ρ_B/g·L^{-1}, n=24)

	1周	2周	3周	4周	6周	8周
白蛋白	51.02±6.3	47.12±5.4	56.91±5.3	52.91±7.9	61.84±1.9	63.24±2.1
球蛋白	27.18±3.2	21.42±2.2	23.91±4.9	20.72±2.8	32.59±2.7	33.70±3.2

表2 氮平衡动态变化(n=24)

	1周	2周	3周	4周	6周	8周
出氮(ρ_B/g·L^{-1})	24.70±6.2	34.1±8.6	28.8±5.8	27.9±10.7	27.46±6.9	25.6±4.3
入氮(ρ_B/g·L^{-1})	16.89±3.2	19.16±4.6	19.6±1.9	23.2±3.1	26.72±3.8	27.20±5.9
氮平衡(g/24 h)	−7.81±3.0	−14.9±4.0	−9.2±3.9	−4.7±7.6	−0.74±3.1	−1.6±1.6

3 讨论

奥力康肠道营养素制剂除了供给三大营养素、电解质、微量元素、维生素外，还添加了对肠胃功能有调理作用的中药，以及对胃肠粘膜结构与功能有明显维护和改善作用的谷氨酰胺。动物实验证明，奥力康可维护胃肠粘膜结构和功能[3]。

奥力康营养结构符合中国人饮食特点。糖、脂肪含量相对较低，口感较好，调制方便(开水冲服)。从患者体重、三头肌皮皱、白球蛋白、氮平衡的变化来看，奥力康的营养成分合理，营养调理作用是明显的。

奥力康在喂养中应掌握"尽早开始，多次少量，循序渐进"的原则。若无休克征象，严重烧伤患者应在伤后尽早开始喂养，已有休克征象，则应待休克平稳后再实施。喂养时间可从伤后8 h开始，首次剂量30 g+水50 ml，若无休克征象，经喂养后反应良好即腹不胀，肠鸣音存在，经营养管抽吸无潴留者，可逐渐加量，但伤后第1个24 h供给量不宜超过200 g。

关键词：烧伤；肠内营养；护理

中图法分类号：R459.3 文献标识码：B

参考文献：

[1] 汪仕良，黎鳌，尤忠义，等. 烧伤早期肠道营养[J]. 肠内与肠外营养杂志，1994，1(1)：1—3.

[2] 陈秋鸣，林锋，郑幼金. 严重烧伤病人的营养护理[J]. 中华护理杂志，1998，33(4)：205—207.

[3] 徐庆连，汪仕良，尤忠义. 一种肠内营养素的营养性研究[J]. 中国肠内肠外营养杂志，1999，5(2)：82—85.

(编辑 谢义霞)

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