

hIL-10基因修饰的L02肝细胞的克隆培养和最高表达株的筛选

代文杰, 胡震, 武林枫, 姜洪池, 吴耀华, 潘尚哈

■背景资料

IL-10是Th2细胞因子的重要代表, 大量研究证实, 在肝硬化进程中发挥负性调节作用, 是肝硬化治疗中具有潜力的细胞因子。

代文杰, 胡震, 武林枫, 姜洪池, 吴耀华, 潘尚哈, 哈尔滨医科大学第一临床医学院肝胆胰外科, 黑龙江省肝胆外科重点实验室 黑龙江省哈尔滨市 150001

代文杰, 博士, 博士后, 主要从事肝胆胰外科、器官移植、外科分子细胞生物学研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30070739, 30300340

黑龙江省自然科学基金资助项目, No. D01-04

通讯作者: 代文杰, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院肝胆胰外科, 黑龙江省肝胆外科重点实验室. wenjdai@yahoo.com.cn

电话: 0451-53600281

收稿日期: 2006-03-30 接受日期: 2006-04-13

Clone culture of human interleukin-10 gene modified L02 hepatocytes and selection of cell strain with most interleukin-10 expression

Wen-Jie Dai, Zhen Hu, Lin-Feng Wu, Hong-Chi Jiang, Yao-Hua Wu, Shang-Ha Pan

Wen-Jie Dai, Zhen Hu, Lin-Feng Wu, Hong-Chi Jiang, Yao-Hua Wu, Shang-Ha Pan, Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, the First Clinical Medical College of Harbin Medical University; Key Laboratory of Hepatosplenic Surgery, Heilongjiang Province, Harbin 150001, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30070739 and 30300340, and the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No. D01-04

Correspondence to: Wen-Jie Dai, Department of General Surgery, the First Clinical Medical College of Harbin Medical University; Key Laboratory of Hepatosplenic Surgery, Heilongjiang Province, Harbin 150001, China. wenjdai@yahoo.com.cn

Received: 2006-03-30 Accepted: 2006-04-13

Abstract

AIM: To clone and culture human interleukin-10 (IL-10) gene modified L02 hepatocytes and select the cell strain highly expressing IL-10.

METHODS: With preparation of previously constructed and purified eukaryotic expression plasmid vector pchIL-10, L02 hepatocytes were transfected and then the positive clones were selected with the help of G418 pressure. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expression of human IL-10 in the

cells strain.

RESULTS: Sequencing and restriction endonuclease digestion confirmed that eukaryotic expression plasmid vector pchIL-10 was constructed successfully, and electrophoresis show a band of 540 bp. hIL-10 gene was highly expressed in L02 hepatocytes and the highest expression level was 69.875 ng/10⁶ cell per hour.

CONCLUSION: Human interleukin-10 (IL-10) gene modified L02 hepatocytes can highly expresses hIL-10, which may be used in the antifibrotic or cirrhotic treatment.

Key Words: Interleukin 10; Gene transduction; Liver fibrosis; Liver cirrhosis

Dai WJ, Hu Z, Wu LF, Jiang HC, Wu YH, Pan SH. Clone culture of human interleukin-10 gene modified L02 hepatocytes and selection of cell strain with most interleukin-10 expression. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(15):1458-1461

摘要

目的: 确认hIL-10基因修饰的L02肝细胞的克隆培养可实现hIL-10在L02肝细胞中的高效表达。

方法: 通过构建真核质粒表达载体pchIL-10, 并纯化后转染L02肝细胞。通过G418的压力选择获得hIL-10高表达的克隆株, 并以ELISA测定其表达水平。

结果: 经过测序和酶切验证, 真核质粒表达载体pchIL-10构建成功。电泳显示一长约540 bp条带。hIL-10基因转导可在L02肝细胞中实现hIL-10的高效表达。最高表达株表达量为每小时69.875 ng/10⁶细胞。

结论: hIL-10基因修饰的L02肝细胞的克隆培养可实现hIL-10的高效表达, 为抗肝纤维化、肝硬化提供有效途径。

关键词: 白细胞介素10; 基因转导; 肝纤维化; 肝硬化

代文杰, 胡震, 武林枫, 姜洪池, 吴耀华, 潘尚哈. hIL-10基因修

饰的L02肝细胞的克隆培养和最高表达株的筛选. 世界华人消化杂志 2006;14(15):1458-1461

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1458.asp>

0 引言

人白细胞介素-10(hIL-10)是肝纤维化、肝硬化进程中的重要调控因子, 具有潜在的抗纤维化的作用. 本研究通过构建真核质粒表达载体, 并纯化后感染L02肝细胞, 观察hIL-10的表达. 从而为肝纤维化和肝硬化的基因治疗提供有效途径.

1 材料和方法

1.1 材料 真核表达载体pcDNA3.1(+)由黑龙江省肝脾外科中心实验部保存, 其全长5428 bp, 含CMV(巨细胞病毒)启动子(232-819). 其Bgl II (A/GATCT)酶切位点为12, Sma I (CCC/GGG)位点为2077, EcoR I (G/AATTC)位点为952, BamH I (G/GATCC)位点为929. L02肝细胞是永生化人肝细胞系, 由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供.

1.2 方法

1.2.1 pcDNA3.1hIL-10真核表达载体的构建(图1) pUC18hIL-10和pcDNA3.1质粒的Xba I 酶切: 两种质粒载体, 分别取3 μg和1 μg, 总体积20 μL, 含5×酶切反应缓冲液4 μL, Xba I 2 U, 加ddH₂O至20 μL, 37℃反应2 h. pcDNA3.1/Xba I 继续以CIAP进行去磷酸化反应. 10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 切胶后以Boehringer-Mannheim公司玻璃胶回收试剂盒回收目的片段. 14℃连接反应16 h后, 转化感受态大肠杆菌JM109. 挑取生长良好的菌落克隆行增菌培养, 对正向插入克隆进行测序分析^[1]. 以Promega公司Wizard PureFfection纯化转染质粒. 测序引物为T7启动子通用引物. 构建的pcDNA3.1 hIL-10以下简称pchIL-10. 脂质体转染前24-36 h, 将L02肝细胞重新传代, 调整细胞数量, 使在转染时细胞贴壁生长状态良好, 达60%-70%汇合. 传代及转染时均使用无双抗的RPMI 1640培养液. 按LipofectAMINE Plus说明制备DNA-Plus-LipofectAMINE混合物并转染: 混合物500 μL加入培养瓶的2 μL RPMI 1640中, 轻轻混匀, 37℃, 50 mL/L CO₂条件下培养3 h. 3 h后追加3-4 mL含100 mL/L胎牛血清的完全RPMI 1640培养基, 转染24 h后更换培养液为正常完全培养基继续培养. L02肝细胞正常传代后, 以含不同G418浓度的完全RPMI 1640培养, 绘制生长曲线, 以8 h

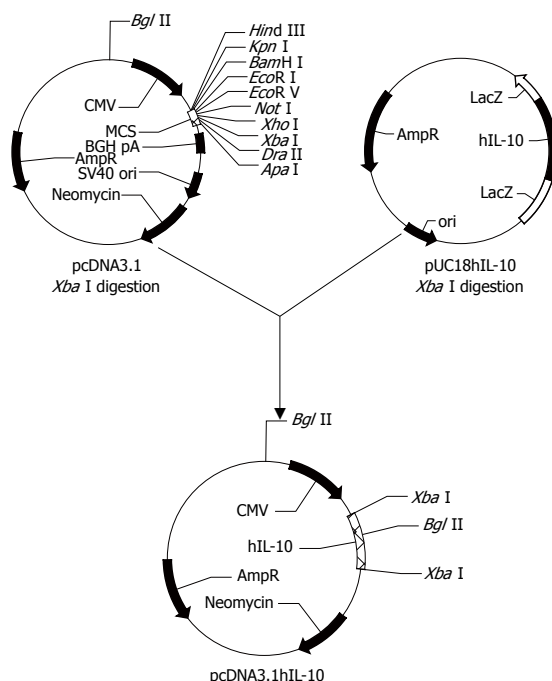


图1 真核表达载体pcDNA3.1hIL-10的构建和鉴定.

表1 引物及序列

引物	序列
CMVP	5'-GCTCGTTTAGTGAACCGT-3'
hIL-10×P1	5'-GCTCTAGAATGCACAGCTCAGCACTGCT-3'
hIL-10×P2	5'-GCTCTAGAGTCTCAGTTTCGTATCTTCAT-3'
hβ-actin1	5'-CATTGTGATGGACTCCGGAGACGG-3'
hβ-actin2	5'-CATCTCCTGCTCGAAGTCTAGAGC-3'

内使L02肝细胞完全死亡的最低浓度作为筛选G418抗性阳性转染克隆的应用浓度. G418毒性试验的药物浓度依次为600, 500, 400, 300, 200, 100 mg/L. 转染后72 h将RPMI 1640培养液更换为含高浓度G418的完全RPMI 1640培养液.

1.2.2 hIL-10的转录 转染72 h与转染2 wk后, 收集细胞, 以GIBCO BRL TRIZOL法提取总RNA和DNA. PCR检测hIL-10在L02肝细胞中表达: hIL-10扩增引物为CMVP/hIL-10XP2, 循环条件: 94℃孵育5 min, 94℃变性40 s, 56℃退火50 s, 72℃延伸1 min, 共35个循环, 最后72℃延伸5 min. RT-PCR检测hIL-10在L02肝细胞中的转录: hIL-10扩增引物为hIL-10XP1/hIL-10XP2. 以hβ-actin为内对照, 扩增片段长度为232 bp(表1). λDNA/EcoR I +Hind III, λDNA/Hind III及hALR为标记(380 bp).

1.2.3 ELISA法检测hIL-10的表达 转染24 h后, 开始收集50 mL培养瓶中培养液行ELISA测定, 分别于1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28 d取样测定.

■研发前沿

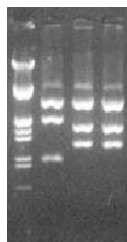
采用IL-10基因转导方式是肝硬化基因治疗的重要方案之一. 本研究旨在克隆获取hIL-10并验证其在肝细胞中的表达.

■相关报道

Louis *et al*证实IL-10在肝纤维化肝硬化过程中发挥负性调节作用, 具有潜在抗肝硬化的功能.

■创新盘点

本文制备IL-10真核表达载体并将IL-10转导L02肝细胞后筛选高表达单克隆并计划扩增培养,并应用于肝硬化的治疗,以期肝硬化基因治疗提供可选方案。



M 1 2 3

图2 pchIL-10真核表达载体的构建和鉴定. M: λ DNA/*EcoR* I + *Hind* III; 1: 正向插入; 2, 3: 反向插入.

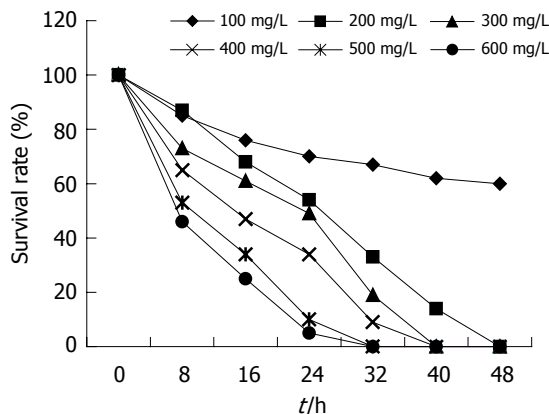


图3 L02肝细胞的生长曲线.

最高表达株的筛选: 转染24 h后, 将细胞按有限稀释法单克隆至96孔培养板内, 待贴壁生长良好后, 以含400 mg/L G418的RPMI 1640作筛选. 待细胞生长为70%-90%汇合后, 收集新更换的24 h培养上清, 按hIL-10 ELISA检测说明书检测hIL-10含量, 同时计数相应孔别的细胞数.

2 结果

2.1 pchIL-10真核表达载体的构建 pchIL-10以 *Xba* I, *Bgl* II酶切鉴定插入片段方向: *Bgl* II酶切正向插入片段为1105 bp, 4860 bp, 反向插入片段为1390 bp和4575 bp(图2). 测序结果显示hIL-10 ORF完全与前述结果吻合^[1]. 每隔8 h计数活细胞数, 绘制48 h存活率曲线(图3), 确定48 h内使培养L02肝细胞完全死亡的最低G418浓度为200 mg/L. L02肝细胞的克隆生长见图4.

2.2 RT-PCR检测 电泳后出现约540 bp (hIL-10), 约380 bp (hALR)和232 bp (h β -actin)电泳条带(图5).

2.3 hIL-10 ELISA检测 hIL-10浓度-时间曲线(图6). hIL-10最高表达株的筛选至96孔板内L02肝细胞克隆生长旺盛, 达80%-90%汇合时测定上清中hIL-10, 最高表达株表达量为69.875 ng/(10⁶h).

3 讨论

人白细胞介素-10基因定位于1号染色体, 为单拷贝基因, 全长8868 bp, 其mRNA为1.8 kb, 开放

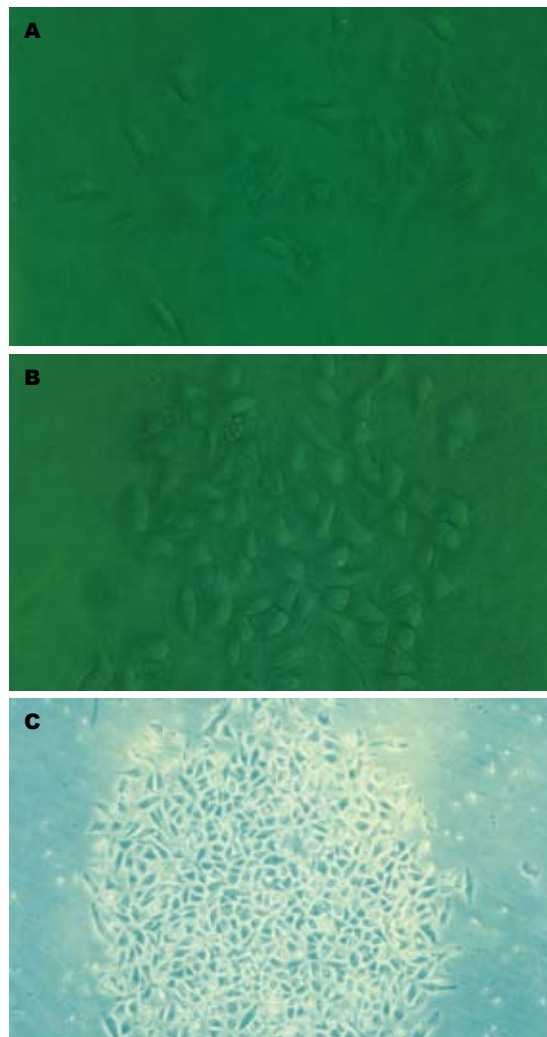


图4 G418筛选下转染阳性呈克隆生长的L02肝细胞. A: $\times 400$; B: $\times 400$; C: $\times 100$.

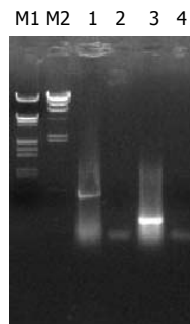


图5 hIL-10的RT-PCR检测. M1: λ DNA/*EcoR* I + *Hind* III; M2: λ DNA/*Hind* III; 1: hIL-10; 2, 4: h β -actin; 3: hALR.

阅读框架为534 bp, 包括编码N-末端信号肽(18个)的序列. 研究证实hIL-10 ORF与EB病毒ORF有70%同源性^[2], 并与马痘疹病毒亦有同源性, 推测EB病毒和马痘疹病毒因具有哺乳动物IL-10同源序列, 在宿主细胞内可合成IL-10类似物, 抑制巨噬细胞和T细胞而逃避宿主抗病毒免疫. hIL-10蛋白质分子量约 M_r 18 700, 活性形式常为二硫键形成的二聚体, 其中含有两个N-糖基化位点, 但无糖链. 另有3个半胱氨酸残基和9个甲

■应用要点

本研究有助于开发实用性IL-10抗肝硬化治疗产品。

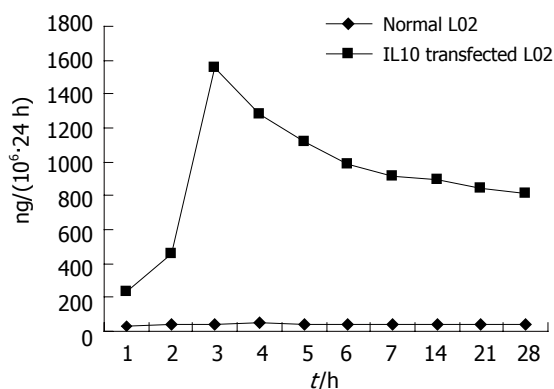


图 6 转染阳性L02肝细胞克隆hIL-10时间-浓度曲线。

硫氨酸残基. 本研究克隆的人IL-10开放阅读框架与GenBank登记序列完全吻合。

现已证实IL-10具有多种生物学功能, 参与了多种疾病的病理生理调节进程^[3-18]. 作为炎症过程的负性调节因子, 其抑制功能主要表现在: 抑制Th1类细胞因子如IL-2、IL-1- β 、IFN- γ 、TNF- α 等的合成及活性, 抑制单核细胞表面MHC II类分子HLA-DR/DP及DQ的表达, 降低单核细胞的抗原提呈能力, 阻断抗原特异性的单核巨噬细胞因子如IL-2、IL-8和TNF- α 的产生. 下调ICAM-1等黏附分子及核转录因子、核因子 κ B的表达, 正向调节IL-1R拮抗剂的表达. 抑制NK细胞的活性, 抑制单核细胞依赖性Th细胞的增生, 抑制反应性氮氧化物产生等。

大量证据表明IL-10参与了肝纤维化、肝硬化过程, 并具有重要的负性调控功能. 因IL-10具有强大的抑制炎症和巨噬细胞活性的功能, 具有潜在的抗肝纤维化、抗肝硬化能力而备受关注^[3-5,9-10,16-18]. 以基因转导或基因修饰细胞移植方式将IL-10导入纤维化或硬化肝脏将成为治疗肝纤维化、肝硬化非常有前途的手段。

4 参考文献

- 1 代文杰, 姜洪池, 潘尚哈, 吕晓颖. 人白细胞介素-10 cDNA的克隆、测序和真核表达载体的构建. 哈尔滨医科大学学报 2001; 35: 4-6
- 2 Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosmann TR. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 1990; 248: 1230-1234
- 3 Howard M, O'Garra A. Biological properties of interleukin 10. *Immunol Today* 1992; 13: 198-200
- 4 Thompson K, Maltby J, Fallowfield J, McAulay M, Millward-Sadler H, Sheron N. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology* 1998; 28: 1597-1606
- 5 Louis H, Van Laethem JL, Wu W, Quertinmont E, Degraef C, Van den Berg K, Demols A, Goldman

- M, Le Moine O, Geerts A, Deviere J. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology* 1998; 28: 1607-1615
- 6 Wang SC, Ohata M, Schrum L, Rippe RA, Tsukamoto H. Expression of interleukin-10 by *in vitro* and *in vivo* activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 302-308
- 7 Thompson KC, Trowern A, Fowell A, Marathe M, Haycock C, Arthur MJ, Sheron N. Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation *In vitro*. *Hepatology* 1998; 28: 1518-1524
- 8 Rai RM, Loffreda S, Karp CL, Yang SQ, Lin HZ, Diehl AM. Kupffer cell depletion abolishes induction of interleukin-10 and permits sustained overexpression of tumor necrosis factor alpha messenger RNA in the regenerating rat liver. *Hepatology* 1997; 25: 889-895
- 9 Meijer C, Wiezer MJ, Diehl AM, Schouten HJ, Schouten HJ, Meijer S, van Rooijen N, van Lambalgen AA, Dijkstra CD, van Leeuwen PA. Kupffer cell depletion by CI2MDP-liposomes alters hepatic cytokine expression and delays liver regeneration after partial hepatectomy. *Liver* 2000; 20: 66-77
- 10 Le Moine O, Marchant A, De Groote D, Azar C, Goldman M, Deviere J. Role of defective monocyte interleukin-10 release in tumor necrosis factor-alpha overproduction in alcoholics cirrhosis. *Hepatology* 1995; 22: 1436-1439
- 11 Reitamo S, Remitz A, Tamai K, Uitto J. Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloproteinase gene expression in cultured human skin fibroblasts. *J Clin Invest* 1994; 94: 2489-2492
- 12 Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 1995; 96: 2304-2310
- 13 Reitamo S, Remitz A, Tamai K, Ledo I, Uitto J. Interleukin 10 up-regulates elastin gene expression *in vivo* and *in vitro* at the transcriptional level. *Biochem J* 1994; 302 (Pt 2): 331-333
- 14 Van Vlasselaer P, Borremans B, van Gorp U, Dasch JR, De Waal-Malefyt R. Interleukin 10 inhibits transforming growth factor-beta (TGF-beta) synthesis required for osteogenic commitment of mouse bone marrow cells. *J Cell Biol* 1994; 124: 569-577
- 15 Ertel W, Keel M, Steckholzer U, Ungethüm U, Trentz O. Interleukin-10 attenuates the release of proinflammatory cytokines but depresses splenocyte functions in murine endotoxemia. *Arch Surg* 1996; 131: 51-56
- 16 Zou XM, Yagihashi A, Hirata K, Tsuruma T, Matsuno T, Tarumi K, Asanuma K, Watanabe N. Downregulation of cytokine-induced neutrophil chemoattractant and prolongation of rat liver allograft survival by interleukin-10. *Surg Today* 1998; 28: 184-191
- 17 Louis H, Le Moine O, Peny MO, Quertinmont E, Fokan D, Goldman M, Deviere J. Production and role of interleukin-10 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 1997; 25: 1382-1389
- 18 Louis H, Le Moine A, Quertinmont E, Peny MO, Geerts A, Goldman M, Le Moine O, Deviere J. Repeated concanavalin A challenge in mice induces an interleukin 10-producing phenotype and liver fibrosis. *Hepatology* 2000; 31: 381-390

■同行评价

本文通过构建表达载体、体外转染的方法研究hIL-10在L02肝细胞中的表达, 实验方法合理, 为肝硬化的治疗提供修饰细胞, 具有一定临床实用意义。

电编 张敏 编辑 潘伯荣