

论著·实验研究

鼠 IL-10 基因腺病毒载体的构建及在骨髓间充质干细胞中的表达

张文婷¹ 唐娟² 赵红梅¹ 游洁玉¹

(1. 湖南省儿童医院消化营养科, 湖南 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410007)

[摘要] **目的** 构建携带鼠 IL-10 (rIL-10) 基因重组腺病毒载体, 并探讨其能否在鼠骨髓间充质干细胞 (MSCs) 中稳定表达。**方法** rIL-10 引物经 PCR 扩增 rIL-10 cDNA 序列, 将回收到的 656 bp rIL-10 DNA 片段克隆入 pcDNA3.1 载体中, 构建 pcDNA3.1-IL-10, 将其与腺病毒载体共转染 HEK293 细胞, 进行细胞内同源重组, 经测序及聚合酶链反应 (PCR) 鉴定重组是否成功; 反复冻融裂解 HEK293 细胞, 将获得的含 rIL-10 基因的病毒液感染 MSCs, Western blot 法检测 rIL-10 在 MSCs 中的表达。**结果** 经测序及 PCR 验证, rIL-10 基因腺病毒载体构建成功, 病毒滴度达 4×10^9 PFU/mL。含 rIL-10 基因的病毒液体外感染 MSCs 后, 可检测到 IL-10 的表达。**结论** 构建重组腺病毒能够介导 rIL-10 基因在 MSCs 中的稳定表达, 为下一步基因移植治疗炎症性肠病提供基础。

[中国当代儿科杂志, 2019, 21(7): 708-712]

[关键词] 炎症性肠病; IL-10 基因; 腺病毒载体; 骨髓间充质干细胞; 大鼠

Construction of rat interleukin-10 adenoviral vector and its expression in bone marrow mesenchymal stem cells

ZHANG Wen-Ting, TANG Juan, ZHAO Hong-Mei, YOU Jie-Yu. Department of Gastroenterology, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China (You J-Y, Email: yjy660111@sina.com)

Abstract: Objective To construct the recombinant adenoviral vector carrying the rat interleukin-10 (rIL-10) gene, and to investigate whether it is stably expressed in bone marrow mesenchymal stem cells. **Methods** The rIL-10 gene was amplified by PCR from template rIL-10 cDNA, and the recovered 656 bp rIL-10 DNA fragment was cloned into pcDNA3.1 to construct pcDNA3.1-IL-10. Then HEK293 cells were transfected with pcDNA3.1-IL-10 and adenoviral vector for homologous recombination, and sequencing and PCR were used to evaluate whether recombination was successful. HEK293 cells were lysed by repeated freeze-thaw cycles, and bone marrow mesenchymal stem cells were infected with the virus solution containing the rIL-10 gene. Western blot was used to measure the expression of rIL-10 in bone marrow mesenchymal stem cells. **Results** Sequencing and PCR verified that the rIL-10 adenoviral vector was successfully constructed, with a virus titer of 4×10^9 PFU/mL. The expression of IL-10 was detected after bone marrow mesenchymal stem cells were infected by the virus solution containing the rIL-10 gene. **Conclusions** The constructed rIL-10 recombinant adenovirus can mediate the stable expression of rIL-10 gene in bone marrow mesenchymal stem cells, which provides a basis for gene transplantation therapy of inflammatory bowel disease.

[Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(7): 708-712]

Key words: Inflammatory bowel disease; Interleukin-10 gene; Adenoviral vector; Bone marrow mesenchymal stem cell; Rats

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 主要包括溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC)、克罗恩病 (Crohn's disease, CD), 病因未明, 发病

机制复杂。近年来随着人们生活水平、检查手段及诊断水平的不断提高, IBD 在我国的发病率呈上升趋势, 其中确诊 IBD 的学龄前及学龄儿童日益

[收稿日期] 2018-12-25; [接受日期] 2019-05-28

[基金项目] 湖南省卫生厅 (B2012-102)。

[作者简介] 张文婷, 女, 硕士, 主治医师。

[通信作者] 游洁玉, 女, 主任医师。Email: yjy660111@sina.com。

增多。鉴于其发病机制尚不明确,病情易反复发作,传统治疗疗效一般,探究IBD的发病机制并进一步寻找新的治疗手段成为IBD研究的热点。

IL-10是一种多功能细胞因子,它是由多种活化的免疫细胞产生,包括Th2细胞、调节性T细胞、自然杀伤细胞、B细胞、单核细胞和巨噬细胞。IL-10被认为是一种免疫调节细胞因子,能有效抑制多种促炎因子及其他炎症介质,并已证实其直接参与了IBD的发病^[1]。IL-10基因编码抗炎细胞因子,IL-10/STAT3信号通路在控制炎症和保护肠组织免受损伤方面发挥重要作用。在IL-10信号转导期间,IL-10与受体IL10RA和IL10RB结合,并激活Jak1和Tyk2,导致STAT3的磷酸化。激活的STAT3易位到细胞核中并调节靶基因转录以促进抗炎反应^[2]。极早发IBD与IL-10、IL-10受体IL10RA和IL10RB的突变有关^[3-4]。Lin等^[5]研究发现除了IL-10基因本身,IL-10/STAT3信号传导途径中基因间上位相互作用,均可增加IBD的发生风险。敲除IL-10基因的小鼠最终可发展为IBD^[6]。IL-10已被鉴定为儿童和成人IBD相关基因^[7-8]。

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有较强的免疫抑制特性,目前MSCs移植被成功应用于循环系统、消化系统、骨关节等严重自身免疫相关疾病的治疗中^[9]。MSCs可通过其分泌的多种细胞因子(转化生长因子、肝细胞生长因子)、NO、前列腺素、吲哚胺2,3加双氧酶等,以及细胞间的直接接触作用抑制T细胞的增殖^[10]。此外,MSCs也可以通过影响树突细胞的分化、成熟过程间接地发挥对T细胞的抑制作用。抑制Th1细胞反应可能直接作用于效应性T细胞, MSCs优先局限于损伤或炎症肠段,基于一系列特定的细胞因子受体的表达,参与炎症组织的细胞转移,并通过产生各种再生因子修复损伤组织。MSCs全身输注后,损伤的结肠组织中Ki67和Lgr5显著增加,说明MSCs可促进肠上皮细胞的分化和增殖^[11]。在小鼠结肠炎模型中, MSCs显示出直接抑制树突细胞和巨噬细胞的抗原呈递功能,使其趋向于致耐受性表型,IL-10分泌增加,并有利于调节性T细胞诱导。另外静脉注射MSCs显著降低了结肠损伤和NF- κ B活性,伴随着促炎细胞因子的减少和IL-10的增加^[12-15]。总之,这些研究

发现表明MSCs在结肠炎中发挥干细胞性和免疫抑制功能,以及其与IL-10之间密不可分的联系。

综上所述,本课题组拟使用IL-10基因转化的MSCs对大鼠结肠炎模型进行移植治疗,探讨IL-10基因转化的MSCs的疗效及其安全性和可靠性,为此本研究首先构建了携带大鼠IL-10(rIL-10)基因的腺病毒载体,并检测其在大鼠MSCs中的表达情况,以备下一步的研究。

1 材料与方法

1.1 质粒及病毒载体

大鼠质粒IL-10、腺病毒载体购自美国BD公司。人胚肾细胞系HEK293细胞由本实验室保存。

1.2 大鼠MSCs的分离与培养

取成年Sprague-Dawley(SD)大鼠,颈椎脱臼处死,无菌条件下分离并截取双侧胫骨和股骨,抽取骨髓细胞,骨髓冲洗液用Percoll分离液进行分离,并收集骨髓细胞。将骨髓细胞接种于含有10%胎牛血清的DMEM低糖培养液培养瓶中,置于37℃、饱和湿度、5%CO₂的培养箱中培养,定时换液,待细胞克隆完全形成后,胰蛋白酶消化传代。

1.3 rIL-10引物

上游:5'-GGCAGATCTATGCTTGGCTCAGCAC-TG-3',含Bgl II酶切位点;下游:5'-GCGATATCC-CTGCAGTCCAGTAGACG-3',含EcoR V酶切位点,扩增片段长度为656 bp。引物自行设计,合成由上海吉凯基因化学技术有限公司完成。

1.4 含rIL-10基因重组腺病毒载体的构建

rIL-10质粒上IL-10序列两端带有Bgl II和EcoR V酶切位点,用rIL-10引物行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增rIL-10 cDNA序列。反应体系:10×Buffer 2 μ L, dNTP 1.6 μ L, 上、下游引物各1.6 μ L, Tag酶1 μ L, 模板DNA 2 μ L, ddH₂O补足至20 μ L。反应条件:96℃预变性3 min; 96℃变性30 s, 65℃退火3 min, 72℃延伸1 min, 35个循环; 72℃延伸7 min。扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳鉴定后,用Omega胶回收试剂盒(OMEGA公司,美国)回收约656 bp的rIL-10 DNA片段。该片段克隆入pcDNA3.1载体(上海吉凯基因化学技术有限公

司)中,构建 pcDNA3.1-IL-10,并测序鉴定。将无血清培养液与 pcDNA3.1-IL-10、腺病毒载体及 lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司,美国)混合后共转染 HEK293 细胞,进行细胞内同源重组,转染 2 周后挑取 2 个病毒噬斑,并提取腺病毒 DNA,经 PCR 鉴定重组是否成功。基因测序由上海吉凯基因化学技术有限公司完成。

1.5 rIL-10 重组腺病毒载体的扩增与滴度检测

确定重组载体成功构建,50%~70% 丰度的 HEK293 细胞铺 6 孔板,并在共转染后 7~10 d 收集 HEK293 细胞,−80℃ 和 37℃ 反复冻融 4 次裂解细胞,1500 r/min × 5 min,收集上清获得病毒颗粒。将病毒上清再次感染 HEK293 细胞以扩增病毒,氯化铯梯度离心法纯化。蚀斑形成单位法检测病毒的滴度,以 HEK293 为靶细胞,每孔以细胞数 1.5×10^6 铺 6 孔板,病毒液以 1 mL 开始行 10 倍稀释至 1×10^{-9} mL,每孔加入 0.1 mL;感染第 3 天覆盖 2% 琼脂糖和 DMEM 的混合液;第 5 天附加 1 次;第 9 天溴化二苯基四氮唑 (MTT) 染色判定结果。

1.6 Western blot 法检测 rIL-10 重组腺病毒载体在鼠 MSCs 中的表达

对数生长期的大鼠 MSCs,细胞数 6×10^6 ,加入滴度 4×10^9 PFU/mL 的 rIL-10 重组腺病毒载体 100 μ L,24 h 后弃病毒液,加入正常的培养液,3 d 后收集细胞,以 PBS 洗 2 次做蛋白抽提,10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳。PBST 洗涤 4 次,将膜放入密封塑料袋,加入 5 mL 封闭液旋转摇动 60 min,倒去封闭液,加入兔抗鼠 IL-10 抗体 (Invitrogen 公司,美国),室温下旋转摇动 60 min,取出膜,200 mL PBST 洗 4 次,每次 15 min,将膜放入新的密封塑料袋中,加入稀释的羊抗兔二抗 (Invitrogen 公司,美国),室温持续摇动 60 min,200 mL PBST 洗膜 4 次,每次 15 min,用碱性磷酸酶显色。

2 结果

2.1 含 rIL-10 基因重组腺病毒载体的构建

pcDNA3.1-IL-10 质粒送测序公司测序,结果与 GenBank 中的 rIL-10 基因 cDNA 序列完全一致。共转染 HEK293 细胞进行细胞内同源重组后,提取重组腺病毒 DNA 经 PCR 扩增,电泳条带 (656 bp) 位于 500~750 bp 之间,见图 1。

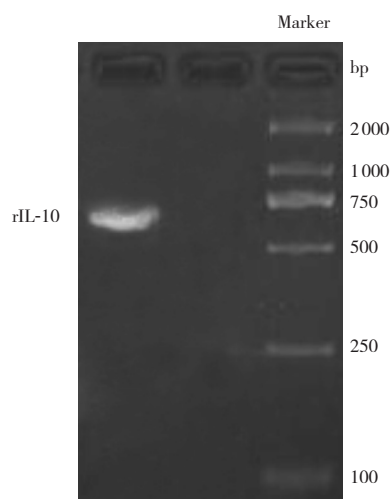


图1 rIL-10 重组腺病毒载体 PCR 结果

2.2 rIL-10 重组腺病毒载体的扩增与滴度检测

转染 HEK293 细胞后收集细胞,反复冻融离心后收集上清液,扩增病毒,经蚀斑形成单位法检测滴度为 4×10^9 PFU/mL。

2.3 rIL-10 重组腺病毒载体在鼠 MSCs 中的表达

用 rIL-10 重组腺病毒载体感染大鼠 MSCs,提取蛋白做 Western blot,感染 rIL-10 重组腺病毒的细胞有 rIL-10 阳性表达,未感染的细胞无条带。见图 2。

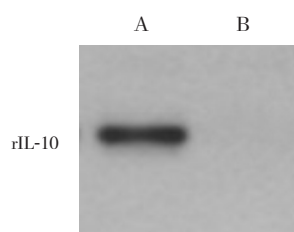


图2 rIL-10 重组腺病毒载体感染大鼠 MSCs 的表达情况 A: rIL-10 阳性表达; B: 未感染腺病毒无 rIL-10 阳性表达。

3 讨论

传统药物治疗 CD 与 UC 的缓解率分别为 70% 和 80%,临床疗效欠佳,长期应用不良反应多,难以维持长期缓解,不能有效缩短 IBD 的自然病程,对危重病例疗效有限,存在停药后复发等问题。尽管特异性单克隆抗体的出现给许多患者带来了福音,但目前仍存在约三分之一的 CD 患者对抗 TNF- α 治疗无应答^[6],并且 10% 的 CD 患者对

所有药物均不能耐受或者是无应答。

体外研究发现,将分离于CD患者肠道固有黏膜层的单个核细胞进行体外培养,加入IL-10后可明显抑制其炎症因子的释放^[17];每天给予静脉注射IL-10可以明显减轻结肠炎模型小鼠的肠道炎症反应^[18]。尽管这种以细胞因子为基础的治疗方式在那些对传统药物没有良好反应的疾病中应用受到大家的关注,但是利用循环系统给予细胞因子有很多缺点:如在体内的半衰期短、全身毒副作用及成本高等。单纯增加用药的浓度并不能有效提高疗效,Tilg等^[19]的研究表明CD患者在静脉应用大剂量IL-10,效果反而不佳,且会引发全身的副作用,如头痛、贫血、发热、血小板减少、周身不适等。为了解决这个难题,Steidler等^[20]首次构建了可产生IL-10的基因工程细菌,采用灌胃治疗葡聚糖硫酸钠致鼠结肠炎和基因缺陷小鼠结肠炎,利用肠道共栖菌乳酸杆菌作为药物传送的载体进行基因治疗,能避免胃酸的分解,并以具有生物活性的形态到达肠道黏膜,使黏膜炎症减轻,但其缓解率不高(50%)。因此为了提高疾病的缓解率及减少药物副作用,探索IL-10新的治疗方式为大势所趋。

MSCs治疗自身免疫相关疾病的机制为:

(1)可分化为具有功能的细胞以修复受损组织,基础研究结果显示骨髓来源的细胞参与炎症肠黏膜的修复过程,并能替代黏膜的构成成分:如肌纤维母细胞、内皮细胞及上皮细胞;(2)具有免疫抑制作用,可抑制T细胞、B细胞、淋巴细胞的活化和功能,降低树突状细胞的抗原呈递作用和功能^[9]。这为干细胞治疗IBD提供了理论依据。一项荟萃分析指出MSCs具有良好的治疗潜力,对IBD患者的不良事件风险较低,特别是对于合并肛周病变并接受局部治疗的患者。MSCs的主要优点是其不需要高剂量化疗及像骨髓造血干细胞移植的预放射治疗,因此,不良反应相对较少。由于MSCs的免疫调节特性,健康供体(而不是IBD患者)也可以用作MSCs的来源而不增加宿主排斥的风险^[21]。IBD常伴随许多肠外表现,如肝胆疾病、皮肤病变、关节炎、骨代谢疾病等,最新研究发现MSCs移植可通过LPS/TLR4通路抑制肠源性内毒素血症和肝脏炎症,改善葡聚糖硫酸钠诱导鼠慢性结肠炎模型相关肝胆并发症,提示MSCs可能成为

慢性结肠炎相关肝胆并发症的新型治疗方法^[22]。

腺病毒载体是临床基因治疗研究中应用最为广泛的载体之一,能进行有效的增殖,产生较高的病毒滴度,对人致病性低,可广泛用于人类及非人类蛋白的表达,非常适用于基因治疗。

本研究成功构建了携带rIL-10的腺病毒载体,病毒滴度高,且可高效率体外感染rMSCs并表达外源基因rIL-10。这为本课题组的进一步基因移植治疗研究提供了坚实的基础。下一步本课题组将rIL-10的腺病毒载体转染的MSCs通过静脉注射治疗三硝基苯磺酸诱导的结肠炎小鼠,观察是否可抑制其肠道炎症细胞因子的释放、缓解肠道炎症损伤,并评估该方法的安全性和可靠性。

[参 考 文 献]

- [1] Miheller P, Lakatos PL, Horváth G, et al. Efficacy and safety of infliximab induction therapy in Crohn's Disease in Central Europe — a Hungarian nationwide observational study[J]. BMC Gastroenterol, 2009, 9: 66.
- [2] Shouval DS, Biswas A, Goettel JA, et al. Interleukin-10 receptor signaling in innate immune cells regulates mucosal immune tolerance and anti-inflammatory macrophage function[J]. Immunity, 2014, 40(5): 706-719.
- [3] Christodoulou K, Wiskin AE, Gibson J, et al. Next generation exome sequencing of paediatric inflammatory bowel disease patients identifies rare and novel variants in candidate genes[J]. Gut, 2013, 62(7): 977-984.
- [4] Shim JO, Seo JK. Very early-onset inflammatory bowel disease (IBD) in infancy is a different disease entity from adult-onset IBD; one form of interleukin-10 receptor mutations[J]. J Hum Genet, 2014, 59(6): 337-341.
- [5] Lin Z, Wang Z, Hegarty JP, et al. Genetic association and epistatic interaction of the interleukin-10 signaling pathway in pediatric inflammatory bowel disease[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(27): 4897-4909.
- [6] Kühn R, Löhler J, Rennick D, et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis[J]. Cell, 1993, 75(2): 263-274.
- [7] Shim JO, Hwang S, Yang HR, et al. Interleukin-10 receptor mutations in children with neonatal-onset Crohn's disease and intractable ulcerating enterocolitis[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2013, 25(10): 1235-1240.
- [8] Doecke JD, Simms LA, Zhao ZZ, et al. Genetic susceptibility in IBD: overlap between ulcerative colitis and Crohn's disease[J]. Inflamm Bowel Dis, 2013, 19(2): 240-245.
- [9] Arthur A, Zannettino A, Gronthos S. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair[J]. J Cell Physiol, 2009, 218(2): 237-245.
- [10] Sémont A, Mouiseddine M, François A, et al. Mesenchymal

- stem cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis[J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(6): 952-961.
- [11] Chen QQ, Yan L, Wang CZ, et al. Mesenchymal stem cells alleviate TNBS-induced colitis by modulating inflammatory and autoimmune responses[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(29): 4702-4717.
- [12] He XW, He XS, Lian L, et al. Systemic infusion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of experimental colitis in mice[J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(12): 3136-3144.
- [13] Qi Y, Jiang D, Sindrilaru A, et al. TSG-6 released from intradermally injected mesenchymal stem cells accelerates wound healing and reduces tissue fibrosis in murine full-thickness skin wounds[J]. *J Invest Dermatol*, 2014, 134(2): 526-537.
- [14] Yang J, Liu XX, Fan H, et al. Extracellular vesicles derived from bone marrow mesenchymal stem cells protect against experimental colitis via attenuating colon inflammation, oxidative stress and apoptosis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0140551.
- [15] Anderson P, Souza-Moreira L, Morell M, et al. Adipose-derived mesenchymal stromal cells induce immunomodulatory macrophages which protect from experimental colitis and sepsis[J]. *Gut*, 2013, 62(8): 1131-1141.
- [16] Yanai H, Hanauer SB. Assessing response and loss of response to biological therapies in IBD[J]. *Am J Gastroenterol*, 2011, 106(4): 685-698.
- [17] Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, et al. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease[J]. *Gastroenterology*, 1995, 108(5): 1434-1444.
- [18] Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor[J]. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19: 683-765.
- [19] Tilg H, van Montfrans C, van den Ende A, et al. Treatment of Crohn's disease with recombinant human interleukin 10 induces the proinflammatory cytokine interferon gamma[J]. *Gut*, 2002, 50(2): 191-195.
- [20] Steidler L, Hans W, Schotte L, et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10[J]. *Science*, 2000, 289(5483): 1352-1355.
- [21] Dave M, Mehta K, Luther J, et al. Mesenchymal stem cell therapy for inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2015, 21(11): 2696-2707.
- [22] Niu GC, Liu L, Zheng L, et al. Mesenchymal stem cell transplantation improves chronic colitis-associated complications through inhibiting the activity of toll-like receptor-4 in mice[J]. *BMC Gastroenterol*, 2018, 18(1): 127.

(本文编辑: 万静)

· 消息 ·

2019年全国新生儿颅脑超声诊断学习班通知

为提高对围产期脑损伤及新生儿其他中枢神经系统疾病的诊断水平,充分利用已有的医疗资源,推广颅脑超声检查诊断技术,北京大学第一医院儿科按计划于2019年8月22~24日举办为期3天的新生儿颅脑超声诊断学习班。本班属国家级教育项目,项目编号:J3-19-03(国),授课教师为本科及北京市著名专家教授。学习结束授予6学分。主要授课内容包括:中枢神经系统解剖;颅脑超声检查方法;新生儿不同颅脑疾病超声诊断;胎儿中枢神经系统的超声诊断;病例分析等。招收学员对象:儿科新生儿专业医师,超声专业医师及技师。学费:2000元。报名截止日期2018年8月8日(上课前2周)。2018年8月21日(星期三)正式报到。

报名方法: <http://w3wdg4fx.eventdove.com/> 报名,填写正确信息保存即可。或者联系北京大学第一医院儿科颅脑超声室。(具体地址请7月份索要正式通知,或者注意报名网站补充信息)

联系人:王红梅,孙国玉,胡文婕。电话:010-83573461或83573213。Email: bdy2002@163.com。邮编:100034。

我们将在开班前1个月寄去正式通知。

北京大学第一医院儿科
2019年3月25日