

文章编号:1005-6947(2008)08-0793-05

· 基础研究 ·

# 人白细胞介素 10 基因慢病毒载体的构建及重组

贺正华, 白念岳, 郭曲练

(中南大学湘雅医院 麻醉科, 湖南 长沙 410008)

**摘要:**目的 拟构建含人白细胞介素 10(hIL-10)基因的慢病毒载体(LV-hIL-10),为进一步探讨慢性疼痛的治疗研究奠定基础。方法 从 pCYIL-10 质粒中选择适当的引物进行 PCR 后得到含 Pme I 多功能酶切位点的 IL-10 基因片段,将其构建到慢病毒载体 pWPXL 上得到重组的 pWPXL-IL-10 质粒,对所抽提的质粒进行酶切及测序检测正确后大量提取备用。将重组质粒 pWPXL-IL-10、包膜质粒 pMD2.G 和包装质粒 psPAX2 共转染 293T 细胞后包装出复制缺陷的慢病毒颗粒,进行病毒滴度的测定。结果 重组质粒酶切鉴定结果显示,pWPXL-IL-10 质粒中有一个 530 bp 左右的插入片断,大小与 IL-10 cDNA(534 bp)基本符合。测序结果显示 pWPXL-IL-10 质粒上插入片段的序列与基因库中 hIL-10 基因序列完全一致。转染后获得了高滴度( $2 \times 10^{10}$ )、高纯度的病毒颗粒。结论 成功构建了含人白细胞介素 10 基因的慢病毒载体 LV-hIL-10,为慢性疼痛治疗的研究奠定了基础。

[中国普通外科杂志,2008,17(8):793-797]

**关键词:** 慢病毒载体;人白细胞介素 10;治疗,基因

**中图分类号:** R 34-33 **文献标识码:** A

## The construction of recombinant lentiviral-vector with human interleukin-10 gene

HE Zhenghua, BAI Nianyue, GUO Qulian

(Department of Anesthesia, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**Abstract:** **Objective** To construct contains human interleukin-10 gene recombinant lentiviral-vector (LV-IL-10) and to form a basis to further explore the therapy of chronic pain. **Methods** hIL-10 gene fragment was isolated and amplified from pCYIL-10 plasmid by PCR, and was cloned into pWPXL-GFP. The inserted hIL-10 fragment was verified by Pme I digestion and DNA sequencing. The recombinant plasmid pWPXL-IL-10-GFP, envelope plasmid pMD2.G and packaging plasmid psPAX2 were cotransfected into 293T cells, to pack out lentivirus particle that has the ability of duplicated-deficiency, then virus titer determination was undertaken. **Results** The 530bp IL-10 gene fragment was amplified from pCYIL-10 plasmid by PCR, and was recombined into pWPXL-GFP plasmid. DNA sequencing confirmed that the cloned gene segment was 100% homologous to the published hIL-10 sequence in genebank. High titer( $2 \times 10^{10}$ ) and highly purified lentiviral particles was obtained. **Conclusions** The lentivirus vector LV-hIL-10 was constructed successfully, which form a basis of research of chronic pain therapy.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(8):793-797]

**Key words:** Lentiviral-vector; Human IL-10; Therapy, Gene

**CLC number:** R 34-33

**Document code:** A

**基金项目:**湖南省自然科学基金资助(06JJ4122)。

**收稿日期:**2008-06-17; **修订日期:**2008-07-19。

**作者简介:**贺正华,女,中南大学湘雅医院麻醉科主治医师,主要从事临床麻醉和慢性疼痛治疗方面的研究。

**通讯作者:**郭曲练, E-mail:qulianguo@hotmail.com

目的基因的转移工具目前多采用病毒载体,其中以逆转录病毒载体和腺病毒载体最为常用<sup>[1-2]</sup>。然而,逆转录病毒载体只能感染分裂期细胞,容纳外源基因的DNA片段长度不超过8 kb,腺病毒载体感染细胞时,病毒DNA游离在细胞核内,并不整合到染色体上,在体内不能实现稳定的长期表达且反复应用容易引起免疫反应。以人类免疫缺陷病毒-1(HIV-1)来源的慢病毒载体由于其具有可以感染非分裂期细胞、容纳外源性目的基因片段大、免疫反应小等特点而越来越受到人们的重视<sup>[3-4]</sup>。有学者<sup>[5-6]</sup>研究发现,重组抗炎细胞因子白细胞介素10(IL-10)腺病毒或腺相关病毒载体对神经病理性疼痛有镇痛作用。本研究拟构建含镇痛基因IL-10基因片段的慢病毒载体(lentivector, LV),为下一步慢性疼痛的治疗研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

包含人IL-10 CDS序列的pCYIL-10质粒由Xianmin Meng博士(Thomas Jefferson大学,美国费城)惠赠;慢病毒载体pWPXL-GFP,包装质粒psPAX2,包膜质粒pMD2.G由瑞士Didier Trono教授惠赠。DH5 $\alpha$ 大肠杆菌菌种购自Promega公司;人胚肾T细胞(293T)细胞株购自湘雅细胞中心;人神经母细胞瘤细胞株SH-SY5Y购自ATCC。Tip500 DNA纯化柱,Spin质粒抽提试剂盒,质粒微量提取试剂盒购自QIAGEN公司。LA Taq酶,dNTP,限制性内切酶PmeI,T4 DNA连接酶购自TakaRa公司。

仪器:超净工作台(苏州净化工程公司),多聚酶链反应仪(GeneAmp 9600 PCR系统,Perkin Elmer公司),Eppendorf台式低温微量离心机(Eppendorf公司),J6-HC高速离心机和J2-21型离心机(Beckman公司),水平电泳仪(Bio-Rad公司),Gel Doc1000凝胶成像分析系统(Bio-Rad公司),ABI 377型DNA测序仪(Perkin Elmer公司),420型恒温空气摇床(Forma公司),激光共聚焦显微镜(Bio-Rad公司)及紫外分光光度计(Beckman公司)等。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 pWPXL-IL-10质粒的构建

1.2.1.1 IL-10 cDNA的扩增 以pCYIL-10为模板,PCR获得IL-10基因全长序列的cDNA。设计含Pme I酶切位点的引物,上游引物为5'-GCGT

TTAAACATGCACAGCTCAGCACTG -3',下游引物为5'-GCGTTTAAACTCAGTTTCGTATCTTCAT-3',引物由上海生物工程有限公司合成。反应条件:95℃ 5 min→(30个循环)94℃ 20 s→50℃ 30 s→72℃ 45 s,72℃ 10 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离检测,检测正确后,用PCR产物纯化试剂盒回收PCR产物。

1.2.1.2 IL-10片段与pWPXL重组 将PCR产物和带绿色荧光蛋白(GFP)标记的pWPXL载体质粒进行PmeI单酶切,37℃酶切2 h。0.8%低熔点琼脂糖凝胶电泳,分离回收目的DNA片段和酶切后的pWPXL载体片段。将回收的目的DNA片段和pWPXL载体片段按配比进行连接,16℃胶连过夜。连接产物转化感受态DH5 $\alpha$ 细菌,挑选阳性克隆扩增培养。离心收集细菌抽提重组质粒。所提取的质粒用Pme I酶切鉴定插入片段,将酶切检测正确的重组质粒进行QIAprep Spin微量制备质粒后,送Invitrogen公司测序。测序正确后,命名为pWPXL-IL-10,并用QIAGEN-tip 500大量提取质粒pWPXL-IL-10,同时用QIAGEN-tip 500大量提取质粒psPAX2和pMD2.G,备转染细胞用。

#### 1.2.2 含IL-10基因表达的LV载体的包装

1.2.2.1 细胞培养及传代 将293T细胞在含10%胎牛血清的1640培养液中培养,2~3 d换液1次,待细胞长至80%~90%融合时,用0.125%胰酶消化传代。

1.2.2.2 磷酸钙沉淀法将三质粒共转染293T包装细胞 按Trono实验室提供的操作方法将重组质粒pWPXL-IL-10,包装质粒psPAX2和包膜质粒pMD2.G共同转染293T细胞:接种293T细胞 $2 \times 10^6/10 \text{ cm}^2 \sim 2.5 \times 10^6/10 \text{ cm}^2$ ,次日将转染载体20  $\mu\text{g}$ 和包装质粒15  $\mu\text{g}$ 及包膜质粒6  $\mu\text{g}$ 加水至0.5 mL,再加0.5 mL的 $2 \times \text{HeBS}$ 混匀后加入2.5 mol/L的CaCl<sub>2</sub>轻轻震荡,室温下放置20~25 min,逐滴加入到培养板上与培养基混匀。6~8 h后更换培养基,去掉有沉淀的培养基,加入新鲜的培养基6 mL继续培养。第4天,收集培养液,室温下3 000 r/min离心5 min,0.45  $\mu\text{m}$ 的滤器过滤收获病毒,该病毒命名为LA-IL-10。将收获的病毒液放入离心管中,4℃下26 000 r/min离心2 h,弃上清,用适量不含血清的培养基重悬病毒,-80℃储存备用。同时也将空质粒pWPXL-GFP与psPAX2、pMD2.G共转293T,并收集上清浓缩后,作后续实验对照之用。

1.2.2.3 病毒滴度的测定 在6孔板中分别接种  $2 \times 10^5$  的 SH-SY5Y 细胞,将所浓缩的病毒按  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  及  $10^{-6}$  进行系列稀释,将其分别加入到相应的孔中;次日在荧光显微镜下观察各孔中 GFP 的荧光表达情况。计数表达 GFP 的细胞个数,乘以相应的稀释倍数即得病毒滴度。

## 2 结果

### 2.1 pWPXL-IL-10 质粒的构建

以 pCYIL-10 质粒为模板,设计合成适当的引物进行 PCR 获得含 PmeI 酶切位点的 IL-10 片段(图 1);通过 T4 连接酶将其与经 PmeI 酶切的 pWPXL-GFP 载体片段连接获得重组质粒 pWPXL-IL-10。

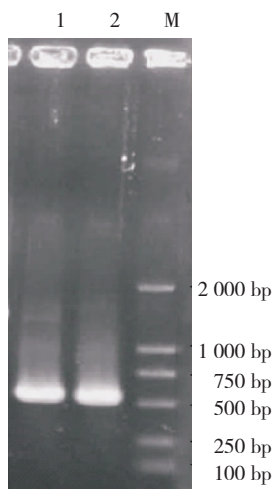


图 1 IL-10 PCR 结果图 1,2: PCR 产物(534bp); M: DL2000 Marker

### 2.2 重组 pWPXL-IL-10 质粒的筛选和鉴定

重组 pWPXL-IL-10 质粒经 PmeI 酶切,凝胶电泳获得长约 534 bp 的插入片段(图 2);进一步质粒测序鉴定结果显示,目的片段插入方向正确,所测序列与 genebank 中 hIL-10 基因序列完全相符(质粒测序结果未显示)。

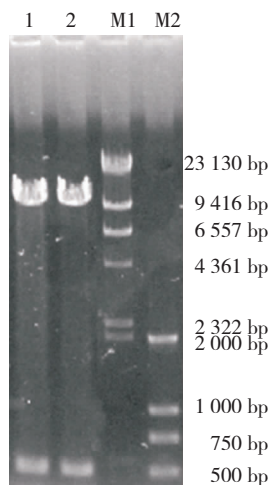


图 2 pWPXL-IL-10 酶切鉴定图 1,2: pWPXL-IL-10 质粒酶切结果; M1:  $\lambda$ Hind III DNA marker; M2: DL2000 DNA marker

### 2.3 重组质粒 pWPXL-IL-10 和包装质粒 ps-PAX2 及包膜质粒 pMD2. G 共同转染 293T 包装细胞

用磷酸钙沉淀法将 3 种质粒共转染 293T 包装细胞,12 h 后在荧光显微镜下均观察到 GFP 的表达。转染 72 h 后,GFP 荧光强度均较 12 h 明显增强,在每一视野下,GFP 表达的阳性包装细胞达 60% 左右(图 3)。超速离心转染 72 h 后的包装细胞上清液,按梯度稀释后,再感染 SH-SY5Y 细胞(此时 SH-SY5Y 作为靶细胞),48 h 后测定 6 孔板中慢病毒载体的浓度,为  $2 \times 10^{10}$  U/L。将纯化的病毒稀释  $10^5$  倍后,感染 SH-SY5Y 细胞。48 h 后荧光显微镜下可观察到 GFP 的表达,感染效率约为 80%,证实该病毒包装系统能够成功包装出病毒颗粒,并再次感染细胞(图 4)。

本实验构建的慢病毒载体是第二代慢病毒载体系统,由 LV pWPXL-GFP,包装质粒 psPAX2 及包膜质粒 pMD2. G 三质粒组成。目的基因片段是 IL-10,经 PCR 扩增、酶切、连接成功地构建了 pWPXL-IL-10 质粒,测序检验正确。

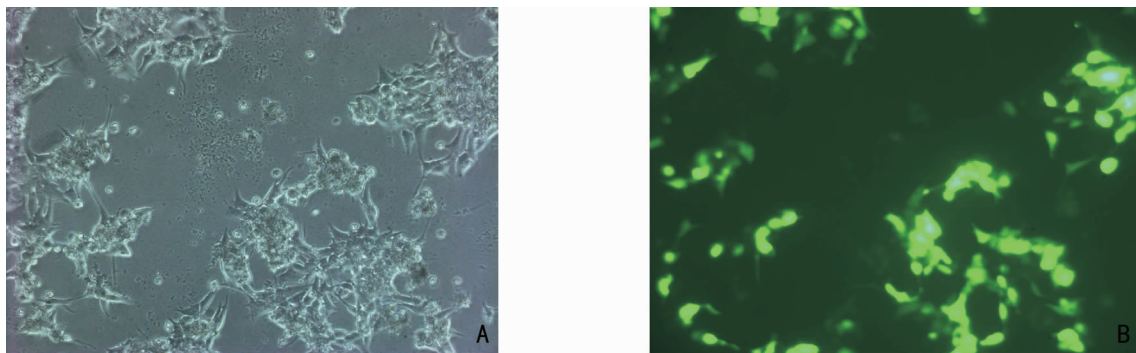


图3 pWPXL-IL-10, psPAX2, pMD2. G 共同转染 293T 细胞 A: 转染后可见光下细胞; B: 转染后荧光下细胞

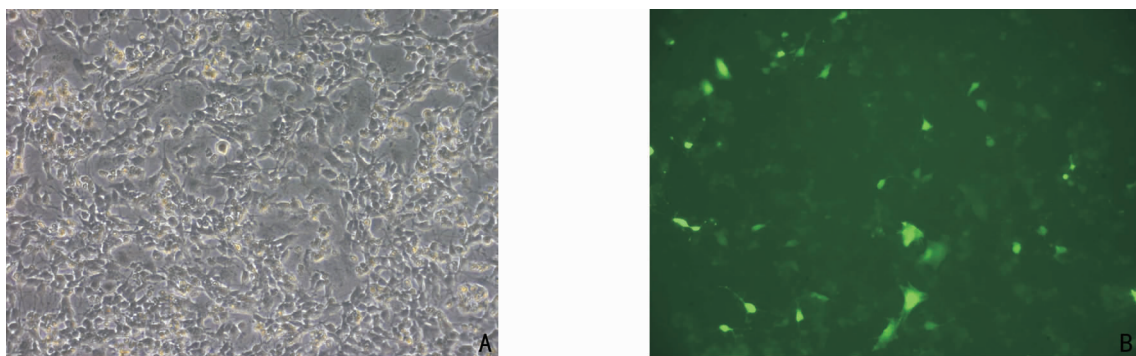


图4 病毒上清感染 SH-SY5Y 细胞 A: 感染后可见光下细胞; B: 感染后荧光下细胞

### 3 讨论

慢病毒属逆转录病毒亚属, 是一类非鼠源性逆转录病毒。以 HIV 为代表, 慢病毒源性载体最主要的优点是能将外源基因整合入非分裂细胞的基因组内, 对有丝分裂后神经元转基因治疗提供了一个潜在的传递系统。为了最大限度地降低其通过重组产生有复制能力野生病毒的可能性, 重组病毒的产生采用 3 种质粒包装系统, 为了进一步增强这一系统的安全性, 一种自我失活慢病毒载体已被成功构建并应用于实验<sup>[7-10]</sup>。应用慢病毒向脑内引入基因已取得了诱人的结果, 转染细胞(主要为神经元)在所有时间点上均明显高于腺相关病毒载体和逆转录病毒载体, 而且这种载体存在长期的转基因表达, 无明显免疫反应。因此慢病毒有可能成为未来中枢神经系统(CNS)基因治疗的最佳载体<sup>[11]</sup>。本实验采用的是 Trono 慢病毒载体课题组提供的第二代 3 质粒包装系统, 能提供较长期稳定的转染, 而且安全性能高。

3 质粒表达系统包括包装质粒、包膜蛋白质粒和转移质粒。其中包装质粒在人巨细胞病毒启动子(CMV)的控制下能表达 HIV-1 复制所需的全部反式激活蛋白, 但不产生病毒包膜蛋白及

辅助蛋白 vpu。应用包膜蛋白质粒编码水疱性口炎病毒 G 蛋白(VSV-G), 包膜的假构型慢病毒载体扩大了载体的靶细胞嗜性范围, 而且增加了载体的稳定性, 允许通过高速离心对载体进行浓缩, 提高了滴度; 转移质粒中除含有包装、逆转录及整合所需的顺式序列外, 还保留了 gag 基因 5' 端 350 bp 的序列和位于 env 序列中的 RRE, 并在其中插入目的基因或标志基因 GFP。将载体系统分成 3 个质粒最大的益处是使序列重叠的机会大大减少, 减少载体重组过程中产生病毒野生株的可能性。

目前常用的内部启动子为 CMV。通过研究不同启动子驱动下的转基因或标志基因在不同靶细胞中的表达发现, 延长因子 1- $\alpha$  (EF1- $\alpha$ ) 是作用最强的内部启动子。文献报道在内部启动子前引入中央多聚嘌呤序列(cPPT)元件可提高目的基因的表达效率; 将此序列插入慢病毒载体可以促进对 CD34<sup>+</sup> 造血干细胞的转导<sup>[12]</sup>。Park<sup>[13]</sup> 等还发现整合了 cPPT 的载体能在体外增加转导效率, 体内能增加对非细胞周期肝细胞的转导效率。李振宇等<sup>[14]</sup> 在 HIV-1 慢病毒载体的构建及结构改造中, 将 cPPT 元件引入到转移质粒中, 证实 cPPT 元件确能提高慢病毒载体的转导效率。这可能与 cPPT 促进 HIV-1 基因组转入被感染的

细胞核内有关<sup>[15]</sup>。Trono 课题组提供的转移质粒含有作用最强的内部启动子 EF1- $\alpha$ , 而且在内部启动子前导入了 cPPT 元件, 进一步提高了目的基因的转染效率。本实验按照 Trono 实验室提供的操作技术直接运用磷酸钙沉淀法将 3 种质粒共转染 293T 细胞, 其优点是操作简单, 病毒滴度理想, 超速离心后病毒滴度可达  $2 \times 10^{10}$  U/L, 安全性高。

IL-10 又称细胞因子合成抑制因子 (CSIF), 属于细胞因子中的干扰素家族, 是重要的抗炎细胞因子。IL-10 通过下调单核细胞表面主要组织相容性抗原 II (MHCII) 的表达, 降低其抗原递呈作用, 下调 T 淋巴细胞活性, 抑制炎症细胞的激活、迁移和黏附; IL-10 也能抑制多种细胞合成与释放促炎细胞因子。鉴于促炎细胞因子在多种神经病理性疼痛发生和维持中的重要作用, 有学者观察了 IL-10 对神经病理性疼痛的治疗作用<sup>[16-19]</sup>, 发现 IL-10 对脊髓损伤、慢性坐骨神经压迫性损伤、鞘内注射强啡肽等原因导致的大鼠神经病理性疼痛有显著治疗效果。重组 IL-10 蛋白在体内的生物半衰期短且价格昂贵, 临床应用受限制, 基因治疗因其一次给药便可长时间地使蛋白表达而受到青睐。随着分子生物学技术的发展和基因治疗方法的改进, IL-10 将越来越多地应用于多种疾病的基因治疗。

目前关于应用慢病毒载体转载目的基因治疗慢性疼痛的报道甚少。本研究旨在构建慢病毒载体转载疼痛治疗基因 IL-10 进行动物体内外实验, 提高 IL-10 的表达抑制炎症性细胞因子而发挥镇痛作用。本实验通过运用基因重组、3 质粒表达系统包括包装质粒、包膜蛋白质粒和转移质粒共转 293T 细胞包装出高滴度的 LV/hIL-10, 为下一步在体和离体动物实验奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] VandenDriessche T, Vanslembrouck V, Goovaerts I, *et al.* Long-term expression of human coagulation factor and correction of hemophilia after in vivo retroviral gene transfer in factor-VIIIdeficient mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(18):10379-10384.
- [2] Connelly S, Smith TA, Dhir G, *et al.* In vivo delivery and expression of physiological levels of functional human factor-VIII in mice [J]. *Hum Gene Ther*, 1995 Feb; 6(2):185-193.
- [3] Naldini L, Blomer U, Gally P, *et al.* In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector [J]. *Science*, 1996, 272(5259):263-267.
- [4] Kafri T, Blomer U, Peterson DA, *et al.* Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors [J]. 1997, 17(3):314-317.
- [5] Milligan ED, Langer SJ, Sloane EM, *et al.* Controlling pathological pain by adenovirally driven spinal production of the anti-inflammatory cytokine, interleukin-10 [J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 21(8):2136-2148.
- [6] Milligan ED, Sloane EM, Langer SJ, *et al.* Controlling neuropathic pain by adeno-associated virus driven production of the anti-inflammatory cytokine, interleukin-10 [J]. *Mol Pain*, 2005, 25(1):9-22.
- [7] Hanawa H, Persons DA, Nienhuis AW. Mobilization and mechanism of transcription of integrated self-inactivating lentiviral vectors [J]. *J Virol*, 2005, 79(13):8410-8421.
- [8] Logan AC, Haas DL, Kafri T, *et al.* Integrated self-inactivating lentiviral vectors produce full-length genomic transcripts competent for encapsidation and integration [J]. *J Virol*, 2004, 78(16):8421-8436.
- [9] Cockrell AS, Ma H, Fu K, *et al.* A trans-lentiviral packaging cell line for high-titer conditional self-inactivating HIV-1 vectors [J]. *Mol Ther*, 2006, 14(2):276-284.
- [10] Semple-Rowland SL, Eccles KS, Humberstone EJ. Targeted expression of two proteins in neural retina using self-inactivating, insulated lentiviral vectors carrying two internal independent promoters [J]. *Mol Vis*, 2007, 18(13):2001-2011.
- [11] Xu K, Ma H, McComm TJ, *et al.* Generation of a stable cell line producing high-titer self-inactivating lentiviral vectors [J]. *Mol Ther*, 2001, 3(1):97-104.
- [12] Sirven A, Pflumio F, Zennou V, *et al.* The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells [J]. *Blood*, 2000, 96(13):4103-4110.
- [13] Park F, Kay MA. Modified HIV-1 based lentiviral vectors have an effect on viral transduction efficiency and gene expression in vitro and in vivo [J]. *Mol Ther*, 2001, 4(3):164-173.
- [14] 李振宇, 徐开林, 潘秀英, 等. HIV-1 慢病毒载体的构建及结构改造 [J]. *中华血液学杂志*, 2004, 25(9):571-572.
- [15] Saade NE, Nasr IW, Masedad CA. Modulation of ultraviolet-induced hyperalgesia and Cytokine upregulation by interleukins 10 and 13 [J]. *Br J Pharmacol*, 2000, 131(7):1317-1324.
- [16] Plunkett JA, Yu CG, Easton JM. Effects of interleukin-10 (IL-10) on pain behavior and gene expression following excitotoxic spinal cord injury in the rat [J]. *Exp Neurol*, 2001, 168(1):144-154.
- [17] Laughlin TM, Bethea JR. Cytokine involvement in dynorphin-induced allodynia [J]. *Pain*, 2000, 84(2-3):159-167.
- [18] Waqner R, Janjiqian M, Myers RR. Anti-inflammatory interleukin-10 therapy in CCI neuropathy decreases thermal hyperalgesia, macrophage recruitment and endoneurial TNF-alpha expression [J]. *Pain*, 1998, 74(1):35-142.
- [19] Yu CG, Fairbanks CA, Wilcox GL, *et al.* Effects of agmatine, interleukin-10, and cyclosporinon spontaneous pain behavior after excitotoxic spinal cord injury in rats [J]. *J Pain*, 2003, 4(3):129-140.