

ROR- γ t 干扰腺病毒载体抑制 Th17 细胞功能

何云锋, 吴小候, 李家兵, 陈刚, 张尧, 唐亚雄

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:设计和构建 ROR- γ t 特异性干扰腺病毒载体, 观察其对大鼠脾脏来源的辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17) 功能的影响。**方法:**设计 ROR- γ t 编码区干扰序列, DNA 聚合酶作用下形成双链序列, 与线性化 pSES-HUS 质粒连接。转入 BJ5183, 转染病毒包装体系 293 细胞系, 收集细胞, 得到病毒液。反复感染 4 次得到高滴度 pSES-HUS-ROR- γ t 病毒液。将其感染大鼠脾脏来源的 Th17 细胞, 检测其对 Th17 细胞功能的影响。**结果:**成功构建和包装 pSES-HUS-ROR- γ t 干扰腺病毒液, Th17 细胞感染 pSES-HUS-ROR- γ t 干扰病毒后, 其分泌细胞因子白介素 (interleukin, IL)-17、IL-6 和 TNF- γ 水平下降。**结论:**pSES-HUS-ROR- γ t 干扰腺病毒能够有效抑制 Th17 细胞功能, 可能对肾移植慢性排斥反应具有抑制或者延缓作用。

【关键词】腺病毒; ROR- γ t; 质粒; 辅助性 T 细胞 17

【中图分类号】R692.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-03-20

Construction of ROR- γ t interference adenovirus and its influence on Th17 cell function

He Yunfeng, Wu Xiaohou, Li Jiabing, Chen Gang, Zhang Yao, Tang Yaxiong

(Department of Urinary Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct the ROR- γ t interference adenovirus, to transfect the ROR- γ t interference adenovirus into T helper cell 17 (Th17 cell) and to detect the change of Th17 cell was after being affected by ROR- γ t interference adenovirus. **Methods:** ROR- γ t interference sequences were designed to form a double chain sequence by DNA polymerase and to connect with the linearized pSES-HUS plasmid. pSES-HUS-ROR- γ t plasmid was transfected into BJ5183 by electroporation, and BJ5183 was transfected into the 293 virus package system. The ROR- γ t interference adenovirus vector was achieved and named as pSES-HUS-ROR- γ t. pSES-HUS-ROR- γ t was infected the Th17 cell which was isolated from the spleen of rat. The changes of IL-17, IL-6 and TNF- γ were detected by ELISA. **Results:** pSES-HUS-ROR- γ t interference adenovirus vector was successfully constructed. Th17 cytokines (IL-17, IL-6 and TNF- γ) were decreased after Th17 being infected with pSES-HUS-ROR- γ t interference adenovirus. **Conclusion:** Th17 cell function can be inhibited by pSES-HUS-ROR- γ t interference adenovirus vector, and the adenovirus vector has the potential treatment function in the chronic rejection of renal transplantation.

【Key words】adenovirus; ROR- γ t; plasmid; T helper cell 17

ROR- γ t 是辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17) 的关键转录因子, Th17 能够促进肾移植慢性排斥的发生, 尤其是在肾移植慢性血管排斥及炎症中起到促进作用。而 Th17 细胞起作用主要依靠 ROR- γ t 激活并刺激 Th17 分泌其起功能的细胞因子。本研究拟对 RNA 干扰 ROR- γ t 的表达, 能否抑制 Th17 细胞功能进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

Th17 细胞为课题组前期实验获得。pSES-HUS 质粒、BJ5183 和 293 细胞逆转录病毒包装体系由芝加哥大学医学中心何通川教授惠赠。T4 DNA 聚合酶 (BD 公司), T4 DNA 连接酶 (BD 公司), Not I, Sfi I 和 EcoR V (BD 公司), 大鼠白介素 (interleukin, IL)-17、IL-6 和 TNF- γ ELSA 检测试剂盒 (Santa Cruz 公司)。

1.2 ROR- γ t 干扰序列设计

根据基因 bank 设计鼠 ROR- γ t (NM_001038600) 设计编码区干扰序列 (19 bp), 上游 5'-GGAAGCGCUGGUCAUGU-GA-3', 下游 3'-GGGAGACGUGGUACUUAGC-5', 连接上

作者介绍: 何云锋, Email: hyf028@163.com,

研究方向: 肾移植。

通信作者: 张尧, Email: zhangyao7407@126.com。

基金项目: 博士点新教师基金资助项目 (编号: 20115503120012)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000298.html>

Sfi I 和 *Not* I 的酶切位点后在 DNA 聚合酶作用下形成双链序列。*Sfi* I 和 *Not* I 双酶切线性化带有启动子的质粒表达载体 pSES-HUS, 在 T4 DNA 连接酶的作用下, 将双链模板与线性化质粒连接为环形质粒 pSES-HUS-ROR- γ t。双酶切及测序鉴定。

1.3 获得高滴度的腺病毒

将 pSES-HUS-ROR- γ t 质粒转入 BJ5183 后转染 293 细胞, 观察转染情况。收集转染后细胞加入 100 μ l 培养基, -80 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 循环裂解细胞 4 次, 离心后收集上清。反复感染 293 细胞 4 次得到高浓度的 pSES-HUS-ROR- γ t 干扰腺病毒。

1.4 转染 Th17 细胞并筛选稳定表达细胞株

将 pSES-HUS-ROR- γ t 干扰腺病毒转染前期分离纯化的大鼠脾脏来源 Th17 细胞。ELSA 检测稳定表达细胞株上清液中 T17 细胞因子 IL-17, IL-6 和 TNF- γ 的变化。同源腺病毒作为阴性对照, 生理盐水做空白对照。

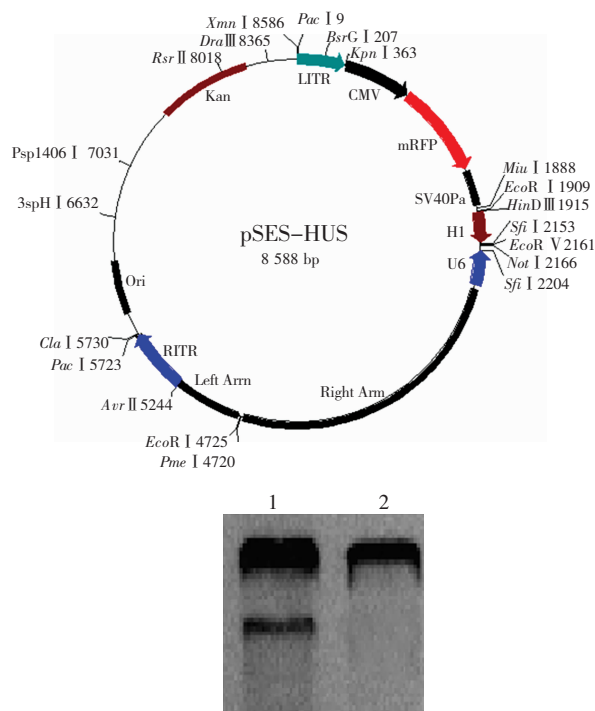
1.5 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件, 计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。检多组间差异比较采用单因素方差分析, 其组间两两比较采用 SNK 法, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 酶切鉴定 pSES-HUS-ROR- γ t 质粒

由于 pSES-HUS 质粒含有 *Eco*R V、*Sfi* I 和 *Not* I 酶切位点, 而 pSES-HUS-ROR- γ t 质粒无 *Eco*R V 位点。重组质粒能够被 *Sfi* I 和 *Not* I 酶切而不能被 *Eco*R V 和 *Sfi* I 酶切(图1)。



1. 重组质粒能够被 *Sfi* I 和 *Not* I 双酶切; 2. 重组质粒不能被 *Eco*R V 和 *Sfi* I 双酶切

图1 重组质粒鉴定

Fig.1 Identification of recombinant plasmid

2.2 pSES-HUS-ROR- γ t 腺病毒包装和扩增

将含有 pSES-HUS-ROR- γ t 质粒的 BJ 转入 293 病毒包装体系, 由于质粒中含有红色荧光蛋白基因序列, 24 h 后可见 293 细胞内表达红色荧光, 细胞形态改变, 部分细胞漂浮和死亡(图2)。当漂浮细胞达到 50% 左右时, 收集细胞, 裂解得到 ROR- γ t 干扰腺病毒液。命名为: pSES-HUS-ROR- γ t。

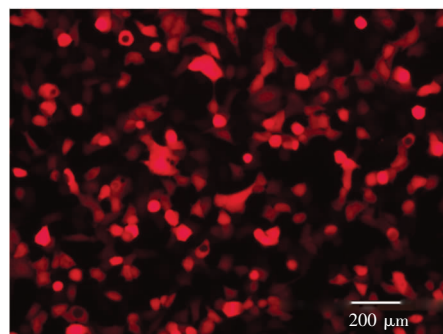


图2 ROR- γ t 干扰腺病毒液感染 293 表达红色荧光

Fig.2 Expression of red fluorescence protein in 293 cells after being infected with ROR- γ t interference adenovirus

2.3 T17 细胞中 IL-17、IL-6 和 TNF- γ 的变化

将 pSES-HUS-ROR- γ t 病毒转染 Lewis 大鼠脾脏来源 Th17 细胞, 2 d 后可检测到细胞内红色荧光的表达, 3 d 可达到 80%。4 d 时检测细胞株上清中 IL-17、IL-6 和 TNF- γ 变化。可见 pSES-HUS-ROR- γ t 病毒组中 pSES-HUS-ROR- γ t 明显下降(表1)。说明 pSES-HUS-ROR- γ t 能够有效抑制 Th17 细胞功能。

表1 各组 Th17 细胞因子水平 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

Tab.1 The level of Th17 cytokines in each group (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-17 ^a	IL-6 ^b	TNF- γ ^c
实验组	4.6 $\pm$ 0.7	5.8 $\pm$ 1.3	27.4 $\pm$ 5.6
阴性对照组	17.8 $\pm$ 2.3	27.2 $\pm$ 6.3	9.8 $\pm$ 2.7
空白对照组	19.9 $\pm$ 3.4	25.9 $\pm$ 2.8	10.5 $\pm$ 4.1
F 值	273.83	268.68	204.06
P 值	0.000	0.000	0.000

注: a, 实验组与阴性对照组比较 $P=0.000$; 实验组与空白对照组比较 $P=0.000$; 阴性对照组和空白对照组比较 $P=0.054$; b, 实验组与阴性对照组比较 $P=0.000$; 实验组与空白对照组比较 $P=0.000$; 阴性对照组和空白对照组比较 $P=0.076$; c, 实验组与阴性对照组比较 $P=0.000$; 实验组与空白对照组比较 $P=0.000$; 阴性对照组和空白对照组比较 $P=0.625$

3 讨 论

肾移植慢性排斥反应引起的慢性移植性肾病是肾移植术后困扰医生的难题, 根据 2005 年 Banff'05 分级会议共识, 采用移植肾间质纤维化和肾小管萎缩来对移植肾进行病理分级, 取代原有 CAN 病

理分级和诊断^[1]。但不管诊断标准如何变化,作为慢性排斥反应实质和基础的移植肾血管慢性排斥始终是问题的核心和关键,而导致这种血管排斥发生最主要的原因就是 Th17 及其分泌的细胞因子^[2],因此对 Th17 及其细胞因子的研究是非常有必要的。

本研究根据 ROR- γ t 基因序列,设计了 19 bp 特异性的小干扰序列,将其双链化后连接到 pSES-HUS 干扰质粒中,形成 ROR- γ t 基因特异性干扰质粒 pSES-HUS-ROR- γ t 干扰质粒。将 pSES-HUS-ROR- γ t 干扰质粒连接到 BJ5183 后,转染 293 病毒包装体系,得到 pSES-HUS-ROR- γ t 特异性干扰腺病毒。这种腺病毒具有特异性干扰细胞内 ROR- γ t 的功能,并且不需要任何转染试剂的协助,即可高效率的干扰目标细胞,同时对目标细胞几乎没有副作用。由于这种腺病毒是瞬时转染,因此其干扰 ROR- γ t 功能会在 2 周后消失,细胞可以恢复到感染前得状态,因此对目标细胞的生物学特点几乎没有影响,是一种很好的瞬时转染和干扰载体^[3-6]。

本研究将 pSES-HUS-ROR- γ t 干扰腺病毒加入 Lewis 大鼠脾脏来源 Th17 细胞,这种细胞由本课题组前期实验获得,并且已经进行了永生。当 pSES-HUS-ROR- γ t 干扰腺病毒加入 Th17 细胞后,可以在 2 d 内观察到细胞内红色荧光的表达,3 d 时可达 80% 左右。4 d 时检测细胞内 Th17 细胞因子 IL-17、IL-6 和 TNF- γ 的变化,发现这 3 个细胞因子水平明显下降,说明当 Th17 细胞内 ROR- γ t 基因被干扰和沉默后,Th17 细胞因子分泌 IL-17、IL-6 和 TNF- γ 功能明显下降。而这 3 个细胞因子则是导致肾移植慢性排斥反应中组织及血管慢性炎症和排斥最重要的细胞因子^[7-8]。由此可以推测,如果能在肾移植排斥反应中通过干扰 ROR- γ t 基因的功能,达到抑制 Th17 细胞因子的目的,减少对移植肾组织及血管的慢性损害,对肾移植慢性排斥反应起到一定的治疗或者延缓作用,则是本研究所期望达到的^[9-11]。

总之,本研究构建的 pSES-HUS-ROR- γ t 腺病毒可以干扰 Th17 细胞关键的转录因子 ROR- γ t 的

表达,达到干扰 Th17 细胞分泌相关细胞因子的功能,可能对肾移植慢性排斥反应的治疗有潜在前景。

参 考 文 献

- [1] Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff'05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN')[J]. *Am J Transplant*, 2007, 7(3): 518-526.
- [2] Wareham AS, Tree JA, Marsh PD, et al. Evidence for a role for interleukin-17, Th17 cells and iron homeostasis in protective immunity against tuberculosis in cynomolgus macaques[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88149.
- [3] Parolini O, Souza-Moreira L, O'Valle F, et al. Therapeutic effect of human amniotic membrane-derived cells on experimental arthritis and other inflammatory disorders[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(2): 327-339.
- [4] Chakraverty R. An unexpected role for platelets in blocking Th17 differentiation[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(2): 480-482.
- [5] Singh B, Schwartz JA, Sandrock C, et al. Modulation of autoimmune diseases by interleukin (IL)-17 producing regulatory T helper (Th17) cells[J]. *Indian J Med Res*, 2013, 138(5): 591-594.
- [6] Liu Y, Cai Y, Dai L, Chen G, et al. The expression of Th17-associated cytokines in human acute graft-versus-host disease[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2013, 19(10): 1421-1429.
- [7] Subramanian V, Mohanakumar T. Chronic rejection: a significant role for Th17-mediated autoimmune responses to self-antigens[J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2012, 8(7): 663-672.
- [8] You P, Xing F, Mao C, et al. Jagged-1-HES-1 signaling inhibits the differentiation of TH17 cells via ROR gamma t[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2013, 27(1): 79-93.
- [9] Sherlock JP, Joyce-Shaikh B, Turner SP, et al. IL-23 induces spondyloarthritis by acting on ROR- γ t+ CD3+CD4-CD8-entheseal resident T cells[J]. *Nat Med*, 2012, 18(7): 1069-1076.
- [10] Michel ML, Mendes-da-Cruz D, Keller AC, et al. Critical role of ROR- γ t in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(50): 19845-19850.
- [11] Hirahara K, Ghoreschi K, Laurence A, et al. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010, 21(6): 425-434.

(责任编辑:唐宗顺)