研究报告

人 IL-37b 基因真核表达载体的构建与表达

姚静[1],程江[2*],裴雪枫[3],王静宇[4],袁明[4*]

(1. 石河子大学医学院,新疆 石河子 832000; 2. 石河子大学第一附属医院检验科,新疆 石河子 832000;
3. 辽宁医学院,辽宁 锦州 121001; 4. 中国航天员科研训练中心,
航天医学基础与应用国家重点实验室,北京 100094)

【摘要】 目的 构建 pEGFP-N1/IL-37b 真核表达载体,并检测其在 THP-1 细胞中的表达情况。**方法** 从人 PBMCs 中提取总 RNA,利用 RT-qPCR 技术扩增出 IL-37b 基因编码区序列,克隆至 pEGFP-N1 真核表达载体,将构建的重组质粒 pEGFP-N1/IL-37b 转染到 THP-1 细胞中,通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测 IL-37 的表达。**结果** 双酶切及基因测序结果显示 IL-37b 基因正确插入真核表达载体 pEGFP-N1 中;RT-qPCR 和 Western blot 结果显示转染 THP-1 细胞后,IL-37 表达水平明显升高($P<0.01$)。**结论** 成功构建了新型抗炎因子 IL-37 真核表达载体 pEGFP-N1/IL-37b,为进一步研究 IL-37 功能及与相关疾病的关系奠定基础。

【关键词】 白细胞介素-37;基因克隆;真核表达载体;THP-1 细胞
【中图分类号】Q95-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1005-4847(2016)03-0268-05
Doi:10.3969/j.issn.1005 – 4847.2016.03.010

Construction and expression of eukaryotic expression vector of human IL-37b gene

YAO Jing[1], CHENG Jiang[2*], PEI Xue-feng[3], WANG Jing-yu[4], YUAN Ming[4*]

(1. Medical College of Shihezi University, Shihezi 832000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Shihezi Medical University, Shihezi 832000; 3. Liaoning Medical College, Jinzhou 121001;
4. Key Laboratory of Space Medicine Fundamentals and Application,
China Astronaut Research and Training Center, Beijing 100094)

【Abstract】 Objective To construct the eukaryotic expression vector pEGFP-N1/IL-37b and analyze the expression of IL-37 gene in THP-1 cells. **Methods** Total RNA was extracted from human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and the coding region of IL-37b gene was amplified by RT-qPCR. Then, the gene was cloned into pEGFP-N1 eukaryotic expression vector. After transfected the recombinant plasmid into THP-1 cells, the expression of IL-37 was detected by RT-qPCR and Western blot. **Results** Double restriction enzyme digestion and gene sequencing showed that IL-37b gene was correctly inserted into the eukaryotic expression vector pEGFP-N1. RT-qPCR and Western blot showed that the IL-37 expression level was increased significantly ($P<0.01$) after transfection in THP-1 cells. **Conclusions** We successfully constructed a novel anti-inflammatory cytokine IL-37 eukaryotic expression vector pEGFP-N1/IL-37b, which lays a foundation for further study on IL-37 functions and its association with related diseases.

【Key words】 Interlukin-37; Gene cloning; Eukaryotic expression vector; THP-1 cells

Corresponding author: YUAN Ming, E-mail:yuanming7711@aliyun.com; CHENG Jiang, E-mail: chengjiang1980@sina.com

[**基金项目**]国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2014CB744404)。
[**作者简介**]姚静(1988 –),女,硕士,研究方向:临床分子生物学诊断,E-mail: yaojing_hnzz@163.com。
[**通讯作者**]袁明(1977 –),男,副研究员,博士,研究方向:空间生物学,E-mail: yuanming7711@aliyun.com;程江(1963 –),男,教授,硕士,研究方向:实验室管理及分子生物学,E-mail: chengjiang1980@sina.com。

IL-37 作为 IL-1 家族 11 个成员之一,最初是由 Kumar 等[1]于 2000 年利用计算机进行生物信息学分析时发现的,并命名为 IL-1H4。后由 Dunn 等[2]于 2001 年命名为 IL-1F7。2010 年,Nold 等[3]正式将 IL-1F7 更名为 IL-37。IL-37 基因位于人类第二号染色体上,共有五种不同的剪切亚型,即 IL-37a ~ e,其中 IL-37b 是五种亚型中分子量最大的一个[4, 5]。IL-37 具有广泛的炎症抑制作用,可抑制外周血单个核细胞、树突状细胞、巨噬细胞及上皮细胞等细胞炎症因子的产生[3, 6],另外在感染性休克、系统性红斑狼疮、炎症性肠病、肝损伤、肝癌等疾病中发挥重要作用[3, 7-10]。本实验利用基因工程相关技术,从人外周血单个核细胞中成功克隆出 IL-37b 全长编码区序列,并构建了其真核表达载体,且成功在 THP-1 细胞中实现了过表达,为进一步研究 IL-37 的生物学功能奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　血液标本

5 mL 人外周血由本实验室课题组成员提供。

1.1.2　质粒、菌株及细胞

pEGFP-N1 质粒、THP-1 细胞由本实验室保存;转化态 *E. coli* DH5α 购自康为世纪。

1.1.3　主要试剂

淋巴细胞分离液、LPS 购自 Sigma;Pfu DNA 聚合酶、质粒抽提试剂盒、胶回收及 DNA 产物纯化试剂盒购自康为世纪;限制性内切酶 *Bam*HI 及 *Eco*RI、T4 DNA 连接酶购自 NEB;反转录试剂盒、SYBR® Green 荧光定量试剂盒购自 TaKaRa;TRIzol 试剂购自 Invitrogen;IL-37 单克隆抗体购自 Abcam(ab57187);GAPDH 单克隆抗体购自 CST(D16H11);胎牛血清、RPMI1640 及 Opti-MEM 培养基购自 Gibco;EntransterTM-D4000 转染试剂购自 Engreen。

1.2　实验方法

1.2.1　总 RNA 提取和 cDNA 合成

分离健康人新鲜外周血单个核细胞于含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基中,加入 1 μg/mL 刺激浓度的 LPS,置于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h,收集细胞。用 TRIzol 法对所收集的细胞进行总 RNA 提取,用反转录试剂盒进行 RT-PCR 合成 cDNA。

1.2.2　目的基因的扩增

根据 GenBank 中 IL-37b(NM_014439.3)的序列分别设计用于扩增 CDs 全长(660 bp)的上下游引物,上游:5′-TCGAATTCTTGAAAATGTCCTTTGTGGGG G-3′,下游:5′-AAGGATCCATATCGCTGACCTCACTGGGGCT-3′(下划线分别为 *Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切位点)。以合成的 cDNA 为模板,用上述引物及 Pfu DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,反应条件如下[11]:94℃预变性 2 min、94℃变性 30 s、60℃退火 30 s、72℃延伸 60 s,共 35 个循环,最后 72℃终延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析回收纯化。

1.2.3　真核表达载体 pEGFP-N1/IL-37b 的构建

用限制性内切酶 *Eco*RI 和 *Bam*HI 分别对回收的 PCR 产物和 pEGFP-N1 空载体进行 37℃双酶切过夜,酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分析回收纯化后,在 T4 DNA 连接酶作用下 16℃连接过夜。将连接产物转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,转化液涂布于含卡那霉素的 LB 平板上,37℃培养过夜,次日随机挑取 8 个平板上单克隆菌落进行菌落 PCR,筛选阳性单克隆菌落扩增提取质粒,进一步对质粒进行双酶切及测序鉴定。

1.2.4　THP-1 细胞的培养及转染

复苏 THP-1 细胞于含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基中,置于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h,次日换液,之后每隔 3 ~ 4 d 进行传代培养,待细胞密度至 70% 左右时,按照 EntransterTM-D4000 转染说明书操作,培养 72 h 后,给予 1 μg/mL 的 LPS 刺激细胞,继续培养 8 h,离心收集细胞。

1.2.5　重组质粒在 THP-1 细胞中的表达及检测

分别提取 THP-1 细胞总 RNA 和总蛋白,采用 RT-qPCR 和 Western blot 方法检测转染前后 THP-1 细胞中 IL-37 mRNA 和蛋白水平的变化。相关引物序列见表 1。

1.2.6　统计分析

实验数据采用 SPSS 17.0 进行统计学分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,图表采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行绘制分析。

2　结果

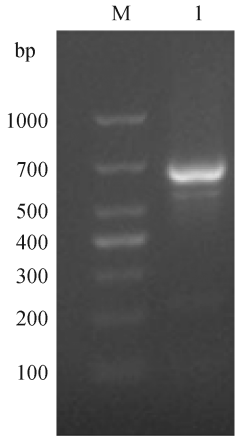
2.1　IL-37b 基因扩增产物的鉴定

IL-37b 基因 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,可见两条略小于 700 bp 且大小相近的一明一暗条带(见图 1),大小与预期相符。

表 1 实时荧光定量 PCR 扩增引物

Tab. 1 Primer pairs for the real-time PCR

基因 Gene name		引物序列 Sequence	产物长度/bp Product length
IL-37b	Forward:	5'-CTTAGAAGACCCGGCTGGAAG-3'	145
	Reverse:	5'-GTCCAGGACCAGTACTTTGTGA-3'	
GAPDH	Forward:	5'-CGGATTTGGTCGTATTGGG-3'	216
	Reverse:	5'-TCTCGCTCCTGGAAGATGG-3'	



注:M:Marker;1:PCR 产物。

图 1 IL-37b 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Note. M: Marker; 1: PCR products.

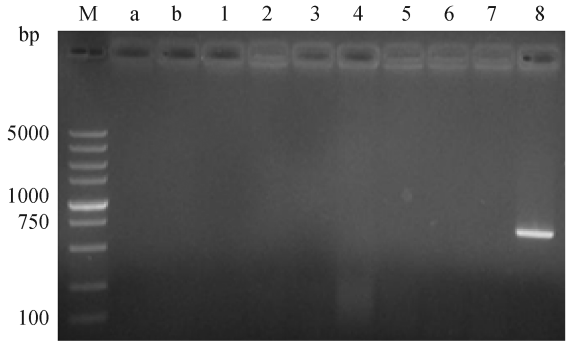
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of IL-37b PCR products.

2.2 重组质粒的鉴定

重组质粒单克隆菌落 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳显示,8 号菌落在略小于 750 bp 处有一明亮的特异性条带(见图 2),对其进行增菌提取质粒,进一步双酶切(*Eco*RI/*Bam*HI),产物琼脂糖凝胶电泳显示,可见约 4700 bp 的载体片段和 660 bp 左右的目的基因片段(见图 3),大小与预期相符。DNA 测序结果显示,构建的重组质粒 pEGFP-N1/IL-37b 中含有 IL-37b 的全长序列(660 bp),Blast 同源性分析显示,与 GenBank 中登录的 IL-37b (NM_014439.3)序列相比,发现有两处碱基存在差异,即 G/T 和 A/G(见图 4),经查证是单核苷酸多态性(SNP)。

2.3 IL-37b 在 THP-1 细胞中的表达

重组质粒 pEGFP-N1/IL-37b 转染 THP-1 细胞后,RT-qPCR 检测结果显示(见图 5),IL-37b 表达较对照组明显升高($P<0.01$),且给予 LPS 刺激后,差异有显著性($P<0.001$)。Western blot 检测结果显示(见图6),在 50 $\times 10^3$左右处可见特异性条带,与预期结果相符;对条带进行光密度量化分析结果显示,IL-37 表达转染组较对照组明显升高($P<0.01$)。

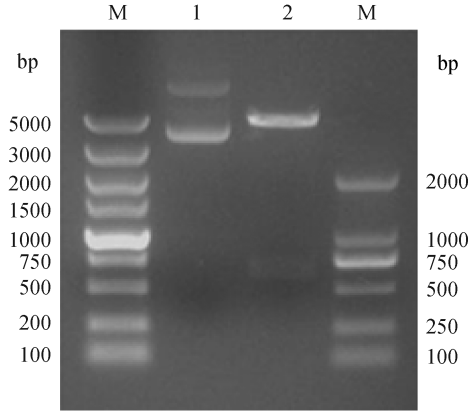


注:M:Marker;a~b:阴性克隆菌落 PCR 产物;
1~8:阳性克隆菌落 PCR 产物。

图 2 菌落 PCR 琼脂糖凝胶电泳

Note. M: Marker; a~b: Negative control;
1~8: Positive colony PCR products.

Fig. 2 PCR agarose gel electrophoresis of the bacterial colonies



注:M:Marker;1:阴性对照;
2:pEGFP-N1/IL-37b 双酶切产物。

图 3 pEGFP-N1/IL-37b 双酶切
产物琼脂糖凝胶电泳

Note. M: Marker; 1: Negative control; 2: Restriction enzyme digestion products of pEGFP-N1/IL-37b.

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of restriction enzyme digestion products of pEGFP-N1/IL-37b.

3 讨论

IL-1 超家族共有 11 个成员,绝大多数是促炎性细胞因子,其中 7 个为激动剂(IL-1α、1L-1β、IL-18、IL-33、IL-36α、IL-36β、IL-36γ),2 个为天然的受体拮

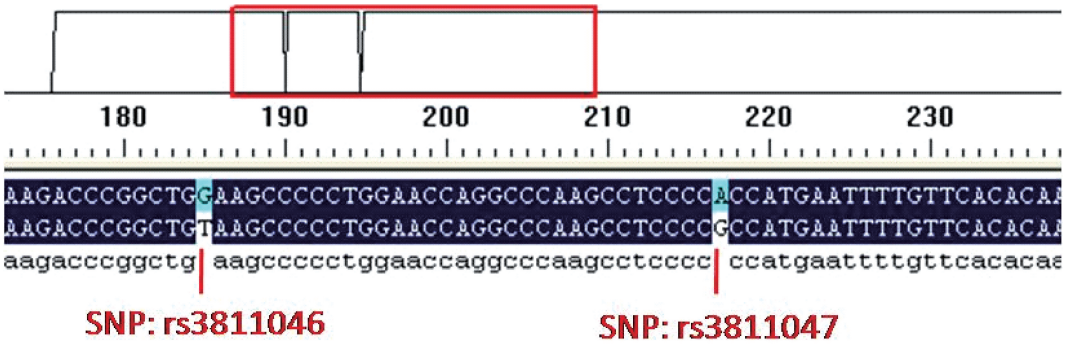
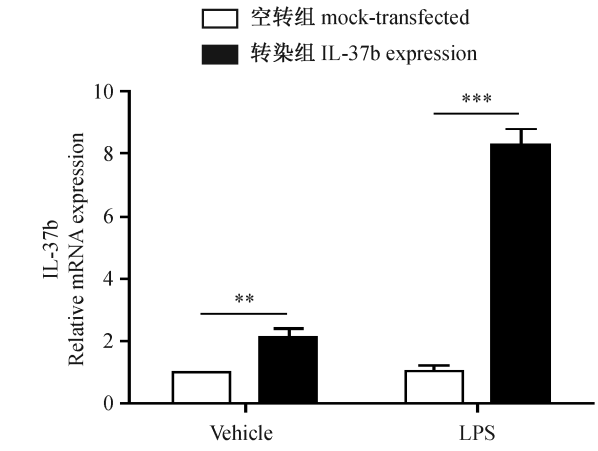


图 4　DNA 序列比对分析部分结果

Fig. 4　Analysis of DNA sequence alignment.

抗剂(IL-1Ra、IL-36Ra)。IL-37 作为第 7 个成员,是一种天然的免疫抑制物,IL-37 作为一种天然的免疫抑制物,可由 TLRs 配体以及一些促炎性细胞因子(IL-1β、TNF-α、IFN-γ 等)刺激的人外周血单个核细胞(PBMCs)、树突状细胞(DCs)诱导产生,能够抑制多种炎症因子的表达。IL-37 基因共有 6 个外显子,通过不同的剪切,形成 5 个剪切亚型(IL-37a-e),但是不同的剪切亚型具有组织特异性,如 IL-37a、b、c 主要表达于淋巴结、胸腺、骨髓、肺、睾丸、胎盘、子宫、皮肤、结肠、NK 细胞、单核细胞、角蛋白细胞和受刺激的 B 细胞中,而 IL-37d、e 只表达与骨髓和睾丸中;大脑中仅表达 IL-37a,肾脏中仅表达 IL-37b,心脏中仅表达 IL-37c[4]。值得一提的是,IL-37 是目前鼠科同系物中唯一没有发现的 IL-1 家族成员[12]。

IL-37b 是五种亚型中分子量最大的一个,包含除 3 号外显子以外的其他 5 个外显子[4, 5],且 1 号外显子可编码 caspase-1 酶切位点,IL-37b 前体经

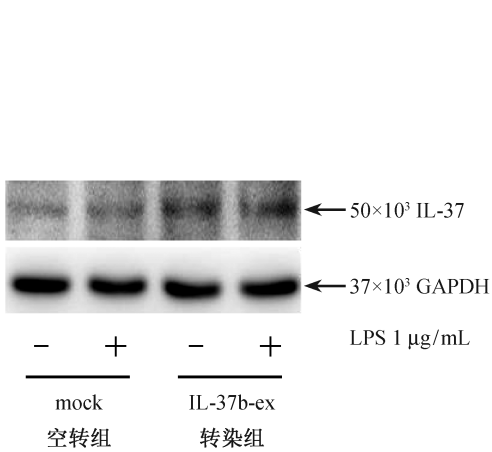


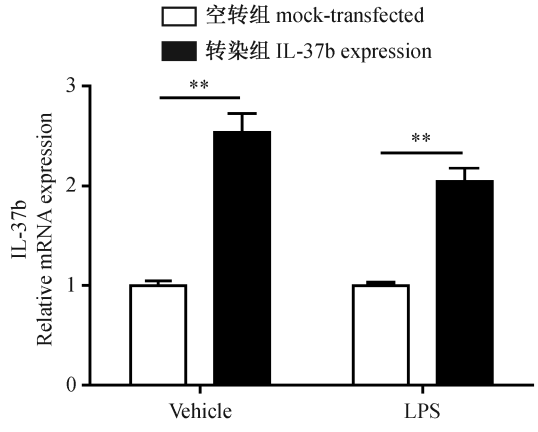
注:转染组与空转组相比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$。

图 5　THP-1 细胞中 IL-37b 基因 mRNA 水平的表达

Note. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ for IL-37b expression vs. mock-transfected.

Fig. 5　IL-37b mRNA expression level in the THP-1 cells





注:转染组与空转组相比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$。

图 6　THP-1 细胞中 IL-37 蛋白水平的表达

Note. Electrophoresis (left) and quantification (right) representation of Western blot. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ for IL-37b expression vs. mock-transfected.

Fig. 6　IL-37 protein expression levels in the THP-1 cells

caspase-1 切割活化后进入细胞核内参与转录调控，实验结果也证实在 caspase-1 催化活性缺失后，IL-37b 的入核能力丧失，同时其炎症抑制作用下降[13]。然而，入核参与转录调控并不是 IL-37 发挥负向调节作用的唯一方式。研究者发现重组 IL-37 能够有效抑制脂多糖(LPS)引起的 IL-6 和 IL-1α 的产生，以及胞内蛋白激酶 JNK、MAPK(p38)、ERK 的磷酸化，从而实现抑制炎症信号的传导，由此证明分泌到胞外的 IL-37 也具有抑制炎症的作用[14]。此外 IL-37 还可通过与 IL-18Rα 结合，进一步募集 IL-1R8，形成一个三聚体装配在细胞表面，抑制 LPS 与其受体 TLR4 的结合，从而抑制炎症反应[15]。在免疫调节方面，IL-37 可抑制树突状细胞的成熟，使其维持在半成熟状态，从而不能有效地发挥其在免疫应答中捕获、处理和呈递抗原的作用，抑制免疫系统识别并且靶标新抗原的能力[6]。

一些动物实验已经证实，IL-37 在疾病的进展中，起到保护作用，如在脂多糖(LPS)诱导的感染性休克、葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎、刀豆素 A(ConA)诱导的肝炎、烟曲霉菌诱导的肺部真菌感染中，发现 IL-37 转基因小鼠的全身炎症反应、局部器官组织的损伤程度较野生对照小鼠减轻、炎症因子的产生减少[3, 8, 9, 16]。另外一些来源于临床样本的研究结果分析显示[17]，不同的炎症性疾病及自身免疫性疾病中，IL-37 的表达有不同程度的上调或下调。

基于 IL-37 潜在的临床应用价值，本实验室从 LPS 刺激的 PBMCs 中成功克隆出大 IL-37b 全长序列，通过琼脂糖凝胶电泳，发现在略小于 700 bp 处有上下两条大小相近的一明一暗条带，根据文献报道[4]，PBMCs 中可表达 IL-37b 和 IL-37c 两种剪切亚型，因此我们考虑明亮且分子量稍大的条带为 IL-37b，而另一条灰暗且分子量略小的为 IL-37c。对 IL-37b 进行胶回收及后续实验，将 IL-37b 编码区全长序列克隆入真核表达载体 pEGFP-N1，该载体含有 SV40 和 CMV 启动子及绿色荧光蛋白 GFP，具有稳定表达、利于检测基因转染效率等优点。经酶切及测序鉴定，发现与 GenBank 中登录的 IL-37b(NM_014439.3)序列有两处碱基存在差异，即 GGA/GTA(甘氨酸/缬氨酸)和 ACC/GCC(苏氨酸/丙氨酸)，经查证均为该基因的两处单核苷酸多态性(SNP:rs3811046 和 rs3811047)。进一步转染 THP-1 细胞，检测到无论是否给与 LPS 刺激，IL-37 表达均显著升高，成功地实现了其在 THP-1 细胞中的过表达，为后续研究 IL-37 与其他免疫调节细胞因子相互作用的分子机制及与相关疾病的关系奠定基础。

参 考 文 献

[1] Kumar S, McDonnell PC, Lehr R, et al. Identification and initial characterization of four novel members of the interleukin-1 family [J]. J Biol Chem, 2000. 275(14): 10308 - 10314.

[2] Dunn E, Sims JE, Nicklin MJ, et al. Annotating genes with potential roles in the immune system: six new members of the IL-1 family[J]. Trends Immunol, 2001. 22(10): 533 - 536.

[3] Nold MF, Nold-Petry CA, Zepp JA, et al. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity[J]. Nat Immunol, 2010. 11(11): 1014 - 1022.

[4] Boraschi D, Lucchesi D, Hainzl S, et al. IL-37: A new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family[J]. Eur Cytokine Netw, 2011. 22(3): 127 - 147.

[5] Banchereau J, Pascual V, O'Garra A. From IL-2 to IL-37: The expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines[J]. Nat Immunol, 2012. 13(10): 925 - 931.

[6] Luo Y, Cai X, Liu S, et al. Suppression of antigen-specific adaptive immunity by IL-37 via induction of tolerogenic dendritic cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. 111(42): 15178 - 15183.

[7] Ye L, Ji L, Wen Z, et al. IL-37 Inhibits the production of inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus: its correlation with disease activity[J]. J Transl Med, 2014. 12: 69.

[8] McNamee EN, Masterson JC, Jedlicka P, et al. Interleukin-37 expression protects mice from colitis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(40): 16711 - 16716.

[9] Bulau AM, Fink M, Maucksch C, et al. In vivo expression of interleukin-37 reduces local and systemic inflammation in concanavalin a-induced hepatitis[J]. Scient World J, 2011. 11: 2480 - 2490.

[10] Zhao JJ, Pan QZ, Pan K, et al. Interleukin-37 mediates the antitumor activity in hepatocellular carcinoma: role for $CD57^+$ NK cells[J]. Sci Rep, 2014. 4: 5177.

[11] 严磊, 李晶, 赵婷婷, 等. 大鼠 CB1 基因真核表达载体的构建及其对 CaSki 细胞凋亡的影响[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(02): 153 - 158.

[12] Bufler P, Azam T, Gamboni-Robertson F, et al. A complex of the IL-1 homologue IL-1F7b and IL-18-binding protein reduces IL-18 activity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(21): 13723 - 13728.

[13] Bulau AM, Nold MF, Li S, et al. Role of caspase-1 in nuclear translocation of IL-37, release of the cytokine, and IL-37 inhibition of innate immune responses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. 111(7): 2650 - 2655.

[14] Li S, Neff CP, Barber K, et al. Extracellular forms of IL-37 inhibit innate inflammation in vitro and in vivo but require the IL-1 family decoy receptor IL-1R8[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. 112(8): 2497 - 2502.

[15] Nold-Petry CA, Lo CY, Rudloff I, et al. IL-37 Requires the receptors IL-18Ra lpha and IL-1R8 (SIGIRR) to carry out its multifaceted anti-inflammatory program upon innate signal transduction [J]. Nat Immunol, 2015. 16(4): 354 - 365.

[16] Moretti S, Bozza S, Oikonomou V, et al. IL-37 inhibits inflammasome activation and disease severity in murine aspergillosis [J]. PLoS Pathog, 2014. 10(11): e1004462.

[17] Chen HM, Fujita M. IL-37: a new player in immune tolerance [J]. Cytokine, 2015. 72(1): 113 - 114.

[收稿日期] 2016-01-06