

全长与成熟形式 IL-37b 的真核表达载体的构建与研究

李梦媛, 韦荣飞, 杨星九, 朱瑞敏, 高 苒*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100121)

【摘要】 目的 构建全长与成熟形式 IL-37b 的真核表达载体 pEGFP N1/IL-37b, 检测二者在 RAW 264.7 细胞中的表达情况。**方法** 以含 IL-37b 全长编码区基因的质粒 pUBC/IL-37b 为模板, 构建能够表达全长与成熟形式 IL-37b 的真核表达载体。将构建的重组质粒 pEGFP N1/IL-37b 转染到 RAW 264.7 细胞中, 通过 western blot 和共聚焦显微镜检测全长与成熟形式的 IL-37b 的表达情况, 并通过 real-time PCR 检测全长与成熟形式 IL-37b 对 LPS 诱导的 IL-6 表达的抑制作用。**结果** 构建的 pEGFP N1/IL-37b 转染后能够在细胞中表达全长与成熟形式的 IL-37b, 并且能够抑制 LPS 诱导的 IL-6 的表达。**结论** 成功构建了全长与成熟形式 IL-37b 的真核表达载体, 为进一步研究 IL-37b 的炎症抑制作用与机制打好基础。

【关键词】 IL-37b; 真核表达载体; 基因克隆

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 02-0059-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.02.010

Construction and characterization of a eukaryotic expression vector of full-length and mature IL-37b

LI Mengyuan, WEI Rongfei, YANG Xingjiu, ZHU Ruimin, GAO Ran*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To construct a eukaryotic expression vector pEGFP N1/IL-37b of full-length and mature IL-37b, and to detect the expression of both full-length and mature IL-37b in RAW 264.7 cells, a mouse macrophage cell line. **Methods** To construct the eukaryotic vectors of full-length and mature IL-37b by using plasmid pUBC/IL-37b as a template containing the coding region of IL-37b full-length gene. To detect the expression of IL-37b by western blot and confocal microscopy after transfected the recombinant plasmid into RAW 264.7 cells, and to detect the inhibition of full-length and mature IL-37b on IL-6 production by real-time PCR. **Results** Eukaryotic vectors pEGFP N1/IL-37b expressed full-length and mature IL-37b after transfection in cells, which inhibited LPS-induced IL-6 production. **Conclusions** Eukaryotic vectors of full-length and mature IL-37b can be successfully constructed, and lays a foundation for further study of anti-inflammation functions and mechanisms of IL-37b.

【Key words】 IL-37b; eukaryotic expression vector; gene cloning

IL-37 是 IL-1 家族细胞因子, 曾经被命名为 IL-1F7^[1], 在人体多种组织、器官中都有表达; 在多种人源细胞系中也能够检测到 IL-37, 如 THP-1、U937、A431、IMTLH、KG -1、HL60、HPBMC、HPT4 和 NHDC

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 - 重大协同创新项目 - 协同创新团队资助 (2016-I2M-3-019); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81601375)。

【作者简介】 李梦媛 (1988—), 女, 硕士生, 研究方向: 免疫学。E-mail: limengyuan767@126.com

【通信作者】 高苒 (1980—), 女, 副研究员, 研究方向: 肿瘤学、免疫学。E-mail: gaoran26@hotmail.com

细胞等^[2-4]。小鼠体内并未发现 IL-37 同类细胞因子的表达^[5],因此小鼠及其来源的细胞系能够排除背景干扰,作为较理想的对象应用于 IL-37 的研究。IL-37 共有 6 个外显子,IL-37b 是 IL-37 五种亚型 a~e 中序列最长的一个,全长的 IL-37b 共有 218 个氨基酸,含有外显子 1、2、4、5、6^[6],并在 1 号外显子处有 caspase-1 酶切位点,能够经其切割转变为成熟形式的 IL-37b^[7],下文分别将二者命名为 FL-IL-37b (full-length-IL37b) 与 M-IL-37b (mature-IL-37b)。目前,大量研究已证明 IL-37b 具备生物学活性,能够作为炎症抑制因子在多种炎症性疾病中发挥功能,同时,这些疾病引起的炎症反应也能够上调 IL-37b 的表达^[8-12]。本实验中构建的 IL-37b 真核表达载体旨在为人类炎症性疾病病理机制的研究提供基础,并为疾病的治疗方案提供潜在的新方法。

1 材料和方法

1.1 材料

含有全长 IL-37b 编码区基因的质粒 pUBC 2 (+) 以及载体质粒 pEGFP N1 由本实验室制备保存。

T4 连接酶、限制性内切酶购自 NEB 公司;DNA 分子量 marker、PCR Premix Taq 购自 TaKaRa 公司;RAW 264.7 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所;IL-37 抗体购自 Abcam 公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购自中杉金桥生物公司;LPS (Lipopolysaccharide) 购自 Sigma 公司;转染试剂 Lipofectamine 2000、TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司;预染蛋白分子量 marker、反转录试剂盒、8 孔腔室载玻片等购自 Thermo 公司;质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司;SYBR green real-time PCR Master Mix 购自 Toyobo 公司;荧光定量 PCR 仪专用 96 孔板与封板膜购自 ABI 公司;实时荧光定量 PCR 仪为 ABI Step One Plus Real-Time PCR System;共聚焦显微镜为 Leica Microsystems;引物合成与 DNA 测序服务由英潍捷基(上海)公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 IL-37b 基因的克隆与 pEGFP N1/IL-37b 真核表达载体的构建

全长与成熟形式的 IL-37b 基因模板来自本实验室制备的含 IL-37b 全长编码区基因的质粒 pUBC/IL-37b。以该质粒为模板,通过 PCR 技术对 FL-IL-37b 与 M-IL-37b 编码区基因进行扩增。上、

下游引物序列见表 1,下划线为 EcoR I 和 Xho I 酶切位点,PCR 反应条件为:95℃ 3 min;95℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 45 s,扩增 30 个循环;72℃ 延伸 10 min,预计目的基因片段大小分别为 654 bp、519 bp。采用琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物,并对目的条带 DNA 进行回收,用于连接构建真核表达载体。用限制性内切酶 EcoR I 和 Xho I 分别对目的基因的 PCR 产物与表达载体 pEGFP N1 进行双酶切,再次进行琼脂糖凝胶电泳,通过胶回收纯化收集酶切产物,于 16℃ 环境过夜连接,构建表达载体。次日,将连接产物转化大肠杆菌 DH5α,吸取约 200 μL 转化液均匀涂布于具有卡那霉素抗性的 LB 平板上,在 37℃ 培养箱中倒置培养过夜。次日,挑选若干菌落进行 PCR,通过琼脂糖凝胶电泳鉴定结果后,将阳性克隆进行 DNA 测序,鉴定 IL-37b 基因片段是否正确插入,阳性克隆质粒命名为 pEGFP N1/IL37b。

表 1 IL-37b 基因引物序列

Tab.1 Primer sequences of IL-37b gene

引物名称 Names	引物序列(5'-3') Sequences (5'-3')
M-IL-37b-F	G <u>GAATTCC</u> ATATGTCCTTTGTGGGGGAGAAC
M-IL-37b-R	CG <u>CTCGAGT</u> AATCGCTGACCTCACTGGGGCTC
FL-IL-37b-F	G <u>GAATTCC</u> ATATGGTTCACACAAGTCCAAAGCTG
FL-IL-37b-R	CG <u>CTCGAGT</u> AATCGCTGACCTCACTGGGGCTC

1.2.2 RAW 264.7 细胞的培养与表达载体的转染

将 RAW 264.7 细胞制成浓度为每毫升 5×10^4 个的细胞悬液,分别接种于 8 孔腔室载玻片与 12 孔细胞培养板,37℃ 培养至细胞贴壁。按照转染试剂 Lipofectamine2000 说明书步骤将 pEGFP N1/IL-37b 质粒转染至 8 孔腔室载玻片与培养板的细胞中。转染完毕更换培养基后加入工作浓度为 500 ng/mL 的 LPS,继续培养 16~18 h。

1.2.3 Western blot 检测转染后细胞中 IL-37b 蛋白的表达

收集 12 孔培养板中的细胞,用 RIPA 裂解液裂解并提取蛋白。配制浓度为 12%~15% 的分离胶,将细胞裂解液进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后进行转膜,将蛋白条带电转至 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h,减少非特异性结合后,按 1:1000 的比例用 IL-37 抗体 4℃ 孵育过夜。次日,用 0.1% 的 PBST 洗膜,加入按 1:5000 比例稀释的 HRP 标记的山羊抗兔 IgG,室温作用 1 h。洗膜后加显影液,观测蛋白条带。

1.2.4 共聚焦显微镜检测转染后细胞中 IL-37b 的表达与定位

弃去 8 孔腔室载玻片中的培养基,用 PBS 洗涤细胞后,用 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 10 min。洗去多余的固定液,用 0.2% 的 Triton X-100 冰上通透细胞 10 min。再次洗涤细胞后,用 DAPI 避光孵育细胞 10 min,对细胞核进行染色。染色后用 PBS 洗涤细胞一次,除去 8 孔腔室,留下下方有细胞贴附的载玻片,用中性树脂封片。待中性树脂晾干后,在 Leica 共聚焦显微镜下观察细胞中 FL-IL-37b 与 M-IL-37b 的表达情况并拍照记录。

1.2.5 Real-time PCR 检测转染细胞中 IL-37b 的抑制作用

收集 12 孔细胞培养板中的细胞,按照 TRIzol 说明书与 Thermo 反转录试剂盒说明书的步骤提取细胞总 RNA,并对 RNA 进行反转录,获得 cDNA。通过 real-time PCR 检测细胞中 IL-6 的相对表达量。GAPDH 与 IL-6 基因的引物序列如表 2 所示,real-time PCR 的反应体系如表 3 所示,反应条件为:保温,95℃ 3 min;95℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,扩增 40 个循环;熔解曲线为 60℃~95℃升温。

表 2 Real-time PCR 引物序列

Tab.2 Primer sequences for the real-time PCR assay	
引物名称 Names	引物序列(5' - 3') Sequences (5' - 3')
IL-6-F	CGGAGAGGAGACTTCACAGAGGA
IL-6-R	GGAGAGCATTGGAATTGGGG
GAPDH-F	AGGTCGGTGTGAACGGATTTC
GAPDH-R	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

表 3 Real-time PCR 反应体系

Tab.3 Real-time PCR reaction components	
组分 Components	体积(μL) Volumes
基因组 DNA	2.0
上游引物	1.0(10 μmol/L)
下游引物	1.0(10 μmol/L)
SYBR green	10.0
ddH ₂ O	6.0
总体积	20.0

1.3 统计学方法

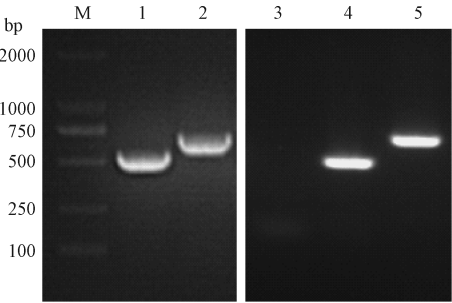
应用 GraphPad Prism V. 5.0 软件对数据进行 *t* 检验及统计学分析,计量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 IL-37b 基因的 PCR 扩增产物与重组质粒的鉴定

M-IL-37b 与 FL-IL-37b 基因的 PCR 扩增产物的

琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示,在 500 ~ 750 bp 之间有两条明亮的条带,一条接近 500 bp,为 M-IL-37b 基因扩增的产物;另一条约在 650 bp 附近,为 FL-IL-37b 基因扩增的产物,与预期的目的基因大小相符。重组质粒单克隆菌落 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果显示,阳性的菌落在与 M-IL-37b 与 FL-IL-37b 基因相近的位置各有一条明亮的特异性条带。对阳性克隆菌落进行 DNA 测序,结果显示 IL-37b 基因片段正确插入 pEGFP N1 质粒,碱基无突变,可进行下一步的转染实验。



注:M;Marker;1:成熟 IL-37b;2:全长 IL-37b;3:阴性对照;4:成熟 IL-37b 阳性克隆菌落;5:全长 IL-37b 阳性克隆菌落。

图 1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Note. M;Marker. 1: M-IL-37b. 2: FL-IL-37b. 3: Negative control. 4: Positive colony of M-IL-37b. 5: Positive colony of FL-IL-37b.

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of the PCR products

2.2 重组表达载体在细胞中的表达

2.2.1 Western blot 检测转染后细胞中 IL-37b 蛋白的表达

如图 2 所示,给予 LPS 刺激后,转染的 RAW 264.7 细胞裂解液的 Western blot 结果显示,有两条特异性的蛋白条带,位置分别在 25 kDa 与 15 kDa 附近,分别为 FL-IL-37b 与 M-IL-37b,条带大小与预期结果相符^[8,13]。证实转染后的 RAW 264.7 细胞中有 M-IL-37b 与 FL-IL-37b 的表达。

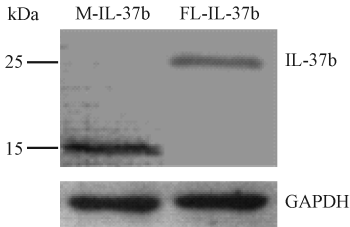


图 2 转染的 RAW 264.7 细胞中 IL-37b 的表达

Fig.2 Expression of IL-37b protein in the transfected RAW 264.7 cells

2.2.2 共聚焦显微镜检测转染后细胞中 IL-37b 的表达与定位

如图 3 所示,绿色为融合了绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的 IL-37b,蓝色为

DAPI 染色的细胞核。转染后,M-IL-37b 主要在细胞核中表达,FL-IL-37b 则在细胞质、细胞核中都有表达;LPS 能够在一定程度上诱导 IL-37b 表达上调。

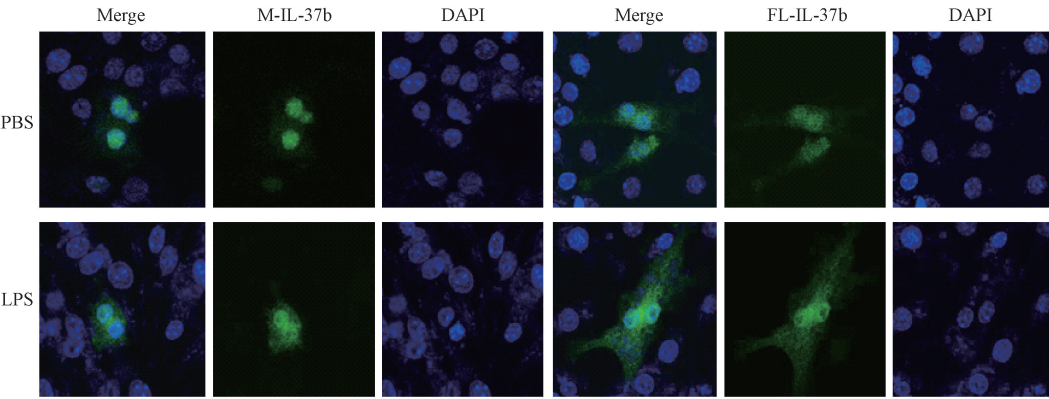


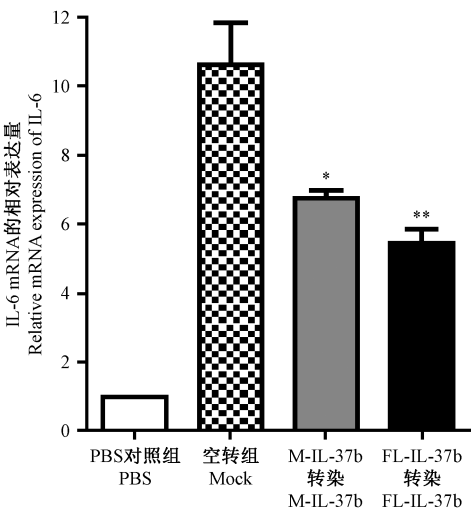
图 3 带 GFP 标签的 IL-37b 在 RAW 264.7 细胞中的表达
Fig.3 Expression of IL-37b with GFP tag in the transfected RAW 264.7 cells

2.3 Real time-PCR 检测转染后的 RAW 264.7 细胞对于 LPS 刺激的抑制作用

如图 4 所示,real-time PCR 结果显示转染 pEGFP N1/IL-37b 质粒的 RAW 264.7 细胞对于 LPS 刺激引起的促炎性细胞因子 IL-6 的表达有抑制作用,与转染空质粒载体的对照组相比差异显著,并且 FL-IL-37b 对于 IL-6 的抑制作用稍强于 M-IL-37b。证实转染的 IL-37b 能够稳定表达并在细胞内发挥炎症抑制作用。

3 讨论

Bulau 等^[7]研究发现,IL-37b 的 1 号外显子能够编码 caspase-1 酶切位点,IL-37b 前体分子需要 caspase-1 切割修饰才能成为成熟分子移入细胞核参与转录调控;突变导致 caspase-1 失活后,IL-37b 不能进入细胞核,并且对炎症反应的抑制作用降低。成熟形式的 IL-37b 进入细胞核后,能够与 Smad 3 (mothers against decapentaplegic homolog 3) 结合形成功能性复合物影响基因转录,并抑制 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 诱导表达促炎症性细胞因子,从而抑制树突状细胞的活化以及相应的免疫应答反应^[8,14]。成熟形式的 IL-37b 的向细胞外分泌同样需要 caspase-1 的作用,但 LPS 诱导的巨噬细胞分泌 IL-37b 前体分子的过程不依赖 caspase-1^[7,14]。用相应的中和抗体中和 IL-37b 转基因小鼠体内的 IL-37b,并注射 LPS 诱导感染性休克,小鼠血清中 IL-6 的表达显著升高,表明 IL-37b 的作用受到



注:与 LPS 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。
图 4 LPS 刺激转染的 RAW 264.7 细胞中 IL-6 的表达 ($n = 3$)
Note. Compared with the LPS group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.
Fig.4 Expression of IL-6 mRNA in the transfected RAW 264.7 cells stimulated by LPS

抗体拮抗,因而证实 IL-37b 能够分泌到细胞外发挥作用,说明其在细胞内外环境中具有双向功能^[7]。同为 IL-1 家族细胞因子的 IL-18 与其受体 IL-18R 结合形成的复合物能够诱导 IFN- γ 表达。IL-37b 与 IL-18 有很高的同源序列,无论是全长还是成熟形式的 IL-37b 都能够与 IL-18R 的 α 链产生结合,且成熟形式 IL-37b 的结合能力较全长形式更强。但 IL-18 与 IL-18R α 的结合能力比 IL-37b 成熟分子更强,因此 IL-37b 不能拮抗 IL-18 的功能。IL-

18BP(IL-18 binding protein)是 IL-18 的天然抑制剂,能够抑制 IL-18 与 IL-18R 的结合;成熟形式的 IL-37b 可以与 IL-18BP 结合,增强 IL-18BP 对 IL-18 信号转导的抑制,从而抑制 IFN- γ 的表达^[15-16]。近年来也有研究显示 IL-37b 发挥作用需要 IL-1 家族细胞因子受体 IL-1R8 参与,IL-1R8 可能与 IL-18R α 一样作为 IL-37b 的受体参与免疫应答。此外,IL-37b 还能够通过抑制 STAT1-4、c-Jun、p38 MARK、ERK 等信号分子的磷酸化来调控促炎信号的传导^[17]。

本实验中构建的真核表达载体 pEGFP N1/IL-37b 含有 SV40 和 CMV 启动子及 GFP 标签,能够稳定表达外源基因并有利于检测基因的转染效率。同时,GFP 有利于检测全长与成熟形式的 IL-37b 在不同细胞器中的定位。实验中采用的 RAW 264.7 细胞系小鼠来源的单核巨噬细胞,自身并无 IL-37 表达,能够排除以人源细胞系作为研究对象产生的背景干扰。LPS 在体内与体外都能够诱导大量促炎性细胞因子的表达^[8],同时,在 LPS 刺激细胞后,IL-37b mRNA 和蛋白的表达水平上调,表明 LPS 能够使 IL-37b mRNA 趋于稳定^[16]。Western blot 与共聚焦显微镜观测结果显示构建的 FL-IL-37b 与 M-IL-37b 的真核表达载体转染后经 LPS 诱导均可表达 FL-IL-37b 与 M-IL-37b,其中 M-IL-37b 主要在定位于细胞核中,FL-IL-37b 则在细胞质、细胞核中都有表达。Real-time PCR 结果显示转染后的细胞中 LPS 诱导的 IL-6 的表达降低,表明转染后 FL-IL-37b 与 M-IL-37b 能够在细胞中发挥炎症抑制作用。上述结果与已报导的文献中的数据相符,证实构建的 pEGFP N1/IL-37b 能够稳定的表达相应的 IL-37b,为进一步研究 IL-37b 在炎症反应中的发挥的作用及其细胞内外机制提供了便利。

参考文献:

[1] Dinarello C, Arend W, Sims J, et al. IL-1 family nomenclature [J]. Nat Immunol,2010,11(11): 973.

[2] Akdis M, Burgler S, Cramer R, et al. Interleukins,1 to 37, and interferon- γ :Receptors,functions,and roles in disease[J]. J Allergy Clin Immunol,2011,127(3): 701 – 721.

[3] Gao W, Kumar S, Lotze MT, et al. Innate immunity mediated by the cytokine IL-1 homologue 4 (IL-1H4/IL-1F7) induces IL-12-dependent adaptive and profound antitumor immunity [J]. J Immunol, 2003, 170(1): 107 – 113.

[4] Kumar S, Hanning CR, Brigham-Burke MR, et al. Interleukin-1F7B (IL-1H4/IL-1F7) is processed by caspase-1 and mature

IL-1F7B binds to the IL-18 receptor but does not induce IFN- γ production [J]. Cytokine,2002,18(2): 61 – 71.

[5] 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.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 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.

[10] Zhao PW, Jiang WG, Wang L, et al. Plasma levels of IL-37 and correlation with TNF- α , IL-17A, and disease activity during DMARD treatment of rheumatoid arthritis [J]. PLoS One, 2014, 9(5): e95346.

[11] 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]. Sci World J, 2011, 11: 2480 – 2490.

[12] Lunding L,Webering S, Voek C, et al. IL-37 requires IL-18Ra and SIGIRR/IL-1R8 to diminish allergic airway inflammation in mice [J]. Allergy, 2015, 70(4): 366 – 373.

[13] Smith DE, Renshaw BR, Ketchem RR, et al. Four new members expand the interleukin-1 superfamily [J]. J Biol Chem, 2000, 275(2): 1169 – 1175.

[14] Sharma S, Kulk N, Nold MF, et al. The IL-1 family member 7b translocates to the nucleus and down-regulates proinflammatory cytokines [J]. J Immunol, 2008, 180(8): 5477 – 5482.

[15] 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.

[16] Bufler P, Gamboni-Robertson F, Azam T, et al. Interleukin-1 homologues IL-1F7b and IL-18 contain functional mRNA instability elements within the coding region responsive to lipopolysaccharide [J]. Biochem J, 2004, 381(Pt2): 503 – 510.

[17] 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.