

•临床研究•

[文章编号] 1007-3949(2000)-03-0256-04

# 人白细胞介素 17 基因探针制备、克隆及在冠心病中的应用

曹开源<sup>1</sup>, 冯炼强<sup>1</sup>, 刘亚光<sup>2</sup>

(中山大学 1. 免疫学教研室, 2. 附属第一医院内科, 广州 510089)

[关键词] 白细胞介素 17; DNA 探针; 核酸杂交; 克隆, 分子; 冠状动脉疾病

[摘要] 为探讨人白细胞介素 17 冠心病在发生发展中的作用。我们应用逆转录多聚酶链反应技术, 利用自行设计合成的引物, 从植物凝血素活化的正常人外周血单个核细胞中, 扩增出人白细胞介素 17 基因, 成功构建了人白细胞介素 17 基因重组体, 经测序确认为人白细胞介素 17 基因, 同时利用随机引物标记基因探针, 经核酸杂交显示冠心病患者人白细胞介素 17 mRNA 表达明显增加, 其相应血清标本中可溶性细胞间粘附分子-1 含量亦增高。说明人白细胞介素 17 在冠心病发病机制中起着重要作用, 并为进一步研究人白细胞介素 17 的生物功能提供可靠的物质基础。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

## Cloning and Probe Preparation of Human Interleukin-17 Gene and It's Application for Patients with Coronary Disease

CAO Kai Yuan, FENG Lian-Qiang, and LIU Ya-Guang

(Department of Immunology, Kidney Institute of the First Hospital, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

**MeSH** Interleukin 17; DNA Probes; Nucleic Acid Hybridization; Cloning, Molecular; Coronary Disease

**ABSTRACT** **Aim** To explore human interleukin 17 (hIL-17) gene in the pathogenesis of coronary disease. **Methods** Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to amplified hIL-17 gene from activated peripheral blood mononuclear cells (PBMC), hIL-17 gene was confirmed by DNA sequencing. Expression of hIL-17 mRNA in PBMC was determined by dot hybridization techniques. Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) was determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method. **Results** With reference to the published sequence of the human IL-17 gene, a pair of DNA primer were designed and synthesized. A 473 bp fragment encoding full length of hIL-17 cDNA gene was successfully amplified by using RT-PCR, and then cloned into pUC18 vector. The recombinant plasmid was sequenced to confirm hIL-17 gene. Meanwhile, Using random prime synthesis of probe for hIL-17 gene. We apply for dot hybridization techniques to determine the over expression of hIL-17 mRNA in peripheral blood monocytes (PBMC) with coronary disease, and their high levels of sICAM-1. **Conclusions** hIL-17 gene may play an important role in the pathogenesis of coronary Disease. Our experiment also lay a profound foundation for further analysis of hIL-17 biological functions.

人白细胞介素 17(human interleukin-17, hIL-17)是新近发现的细胞因子<sup>[1]</sup>, 它由激活的 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞分泌, 目前研究表明它可参与 T 淋巴细胞与造血系统的相互作用, 其主要生物学功能是可以刺激多种其他细胞因子的产生, 如 IL-6、IL-8、G-CSF 和 PGE<sub>2</sub>。并使细胞表面的细胞间粘附分子-1 (ICAM-1) 的表达增加<sup>[2~4]</sup>。动脉粥样硬化的发生·发展与细胞粘附分子和细胞因子有着密切相关的关系<sup>[5~7]</sup>。为此, 我们利用分子生物学技术初步探讨 hIL-17 在冠心病发病中的作用。

[作者简介] 曹开源, 男, 1962 年 5 月出生, 免疫学硕士, 讲师。冯炼强, 男, 1967 年 5 月出生, 免疫学技师。刘亚光, 男, 1964 年 3 月出生, 内科学博士, 副教授。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

正常对照组共 21 例, 男 12 例, 女 9 例, 年龄 40~63 (55.3±8.8) 岁, 为体检合格、经临床及实验室检查排除心脏疾患的健康者。急性心肌梗死组共 15 例, 男 9 例, 女 6 例, 年龄 42~69 (51.2±4.9) 岁, 临床症状、心电图及血清酶学改变符合 1979 年 WHO 诊断标准。冠状动脉狭窄组共 9 例, 男 6 例, 女 3 例, 年龄 41~62 (54.4±3.6) 岁, 均经冠状动脉造影显示狭窄 ≥50%。各组受试对象均排除高血压、糖尿病、脑血管病、周围血管病、感染性疾病、免疫性疾病等。

## 1.2 外周血单个核白细胞 mRNA 的提取

淋巴细胞梯度分离液分离单个核细胞, 正常成人 PBMC 以 Hank's 液洗 3 遍以  $1 \times 10^9/L$  的浓度在含终浓度 30 mg/L 植物血凝素的 RPMI 1640 完全培养基中于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 中培养 48 h, 收集细胞, 以磁性分离系统 (PolyA Tract 1000, Promega) 分离 mRNA, 冠心病患者无需植物血凝素刺激, 直接分离 mRNA, 以作反转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 及斑点杂交备用。

## 1.3 人白细胞介素 17 基因的扩增

根据文献[1]自行设计引物并由中国科学院上海细胞生物研究所合成, 上游引物为 5'-GGGAATTCGATGACTCCTGGGAAGACC-3'; 下游引物为 5'-GAAAGCTTAGGCCACATGGTGGACA-3'。参照 Promega 产品说明书合成 cDNA 第 1 条链。常规聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增 hIL-17 互补脱氧核糖核酸 (complementary DNA, cDNA) 基因。

## 1.4 质粒构建

分别将 PCR 产物和 pUC18 载体用 EcoRI 和 HindIII 双酶切, 在低融点琼脂糖 (LMA) 上回收, T4 DNA 连接酶 (Promega) 连接, 转化大肠杆菌 DH5a, 构建重组质粒 pChIL-17。

## 1.5 质粒酶切鉴定及序列测定

以碱法小量快速制备质粒 DNA, 用 EcoRI/Hind Ⅲ/Pvu Ⅲ/BglI 和 TaqI 酶切质粒, 进行初步鉴定。用 PE 公司 310 型基因分析仪对所得质粒进行 DNA 序列分析。

## 1.6 探针制备及斑点杂交

**1.6.1 白细胞介素 17 基因探针制备** 以 Digoxigenin 11-dUTP 作为标记物, 随机引物法标记 hIL-17 cDNA 探针。标记程序参照宝灵曼公司 DIG-High Prime 试剂盒操作手册进行。

**1.6.2 斑点杂交** 先用蒸馏水浸湿, 然后浸于 10×SSC 中, 10 min, 装于斑点杂交 96 孔点样。将已提取的标本核酸和阴阳性对照进行加热变性, 100℃ 10 min, 立即放入冰水中, 通过 96 孔点样器吸印到硝酸纤维膜上, 室温下凉干后, 80℃干烤 2 h。将膜放入杂交袋中, 加入杂交液 10 mL, (5×SSC, 0.1% Sarkosine, 0.02% SDS, 1% 封阻剂), 排除气泡封口, 68℃水浴, 预杂交 2 h。倒净预交中的溶液, 加 2.5 mL 新杂交溶液, 再加经煮沸变性好的 Dig - hIL-17 基因探针 100 μL 混匀, 68℃水浴杂交 6 h。室温下, 以洗膜液 iv (2×SSC, 0.1% SDS) 100 mL, 5 min, 洗膜 2 次。在 68℃条件下用洗膜液 Ⅲ (0.1×SSC, 0.

1% SDS) 100 mL, 15 min, 洗膜 2 次。显色观察结果。

## 1.7 血清可溶性细胞间粘附分子-1 的测定

采用酶联免疫吸附 (ELISA) 法测定血清可溶性细胞间粘附分子-1, 药盒购自美国 R&D system。

## 1.8 统计学方法

采用 *t* 检验和  $\chi^2$  检验。

# 2 结果

## 2.1 反转录聚合酶链反应扩增人白细胞介素 17 cDNA 基因

以 PHA 活化的正常人外周血单个核细胞 mRNA 为模板, 通过 RT-PCR 扩增得到的产物, 经琼脂糖电泳, 在 480 bp 左右有 1 条明显的带, 与理论设计相符 (图 1, Fig 1), 而未活化的正常人外周血单个核细胞对照中, 未见有特异性扩增片段。

## 2.2 人白细胞介素 17 基因克隆的建立及初步鉴定

克隆所得重组质粒 DNA, 用 EcoRI 和 Hind Ⅲ双酶切鉴定, 可见在 480 bp 左右有 1 条带, 与 PCR 产物相符。同时以 Pvu Ⅲ/BglI 和 TaqI 作酶切, 结果各酶切图谱与理论上的 pChIL-17 序列的电脑分析图谱完全一致 (图 1, Fig 1)。故初步证实这一克隆为 hIL-17 cDNA 克隆。

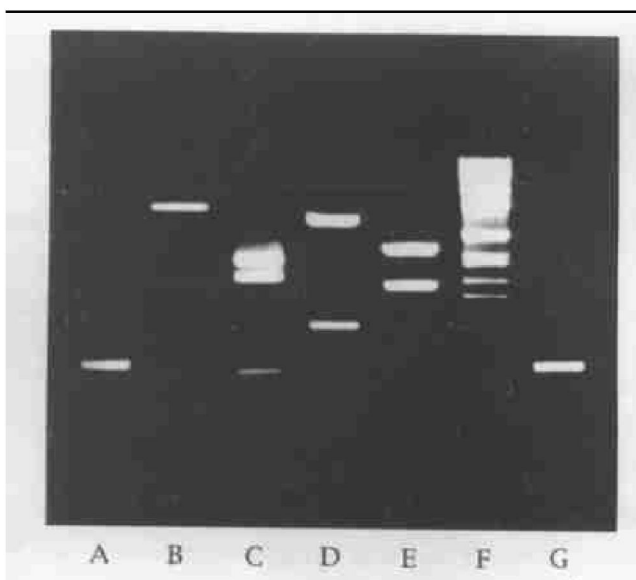


图 1 反转录聚合酶链反应扩增人白细胞介素 17 基因及其重组质粒的酶切鉴定

**Fig 1 Amplification of hIL-17 gene by RT-PCR and identification of recombinant plasmid** A. RT-PCR amplificate activated PBMC. B. pChIL-17/EcoRI/Hind Ⅲ digests (2635, 473 bp). C. pChIL-17/Taq I digests (1444, 1206, 458 bp). D. pChIL-17/Pvu Ⅲ digests (2364, 744 bp). E. pChIL-17/Bgl I digests (1658, 1118, 332 bp). F. Marker Spp I. G. RT-PCR amplificate activated PBMC

### 2.3 序列测定

为了进一步确定所得的克隆,我们利用正负链进行双向 DNA 序列测定,结果表明在 pUC18 中插入的基因为 hIL-17 cDNA 基因。所得到的碱基与国外报道的 hIL-17 cDNA 基因序列完全一致。

### 2.4 外周血单个核细胞的白细胞介素 17 mRNA 的斑点杂交

斑点杂交结果如图 2 (Figure 2) 所示。冠心病组 PBMC 人白细胞介素 17 mRNA 杂交阳性率为 62.5% (15/24), 对照组为 14.3% (3/21), 两者相比有显著差异性 ( $\chi^2 = 10.848, P = 0.001 < 0.01$ ), 提示 hIL-17mRNA 表达在冠心病组明显升高。说明 hIL-17 在冠心病发病机制中有着重要作用。

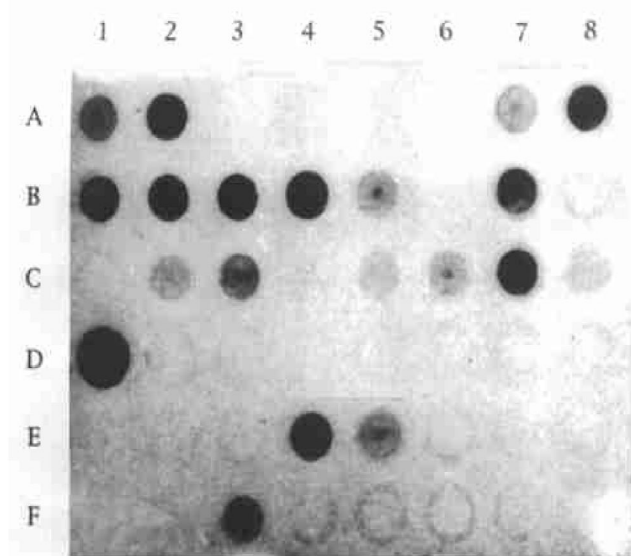


图 2 冠心病患者及正常人 hIL-17 mRNA 的斑点杂交

**Fig 2 Dot hybridization of hIL-17 mRNA from patients with coronary disease and normal controls** 1: coronary disease groups: A1-8, B1-8, C1-8, D1-8. 2: normal controls: D4-8, E1-8, F1-8. 3: D1 positive control, D2 negative control, D3 vacuum control.

表 1 冠心病患者及正常人血清血清可溶性细胞间粘附分子-1 水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 1 Serum levels of sICAM-1 of patients with coronary disease and normal controls**

Groups	n	sICAM-1 ( $\mu\text{g/L}$ )
Normal control	21	163.2 $\pm$ 24.2
Coronary disease	24	398.4 $\pm$ 82.3 <sup>b</sup>
hIL-17 mRNA (+)	15	478.2 $\pm$ 102.6
hIL-17 mRNA (-)	9	234.5 $\pm$ 65.2 <sup>d</sup>

b:  $P < 0.001$ , compared with normal control group. d:  $P < 0.001$ , compared with hIL-17 mRNA (+) group.

### 2.5 血清可溶性细胞间粘附分子-1 检测结果

冠心病患者及正常人血清可溶性细胞间粘附分

子-1 水平见表 1 (Table 1)。可见冠心病患者血清可溶性细胞间粘附分子-1 水平明显高于正常人, 且血清可溶性细胞间粘附分子-1 水平在冠心病组 hIL-17 mRNA 表达阳性病人明显高于阴性病人, 提示冠心病病人 hIL-17 mRNA 和血清可溶性细胞间粘附分子-1 密切相关。

### 3 讨论

研究表明, 细胞因子和细胞粘附分子参与了动脉粥样硬化的发病机理。白细胞介素 6 可诱导肝产生急性期反应蛋白 (CRP), CRP 与血液粘度, 血小板数量和活性相关, 白细胞介素 6 可诱导肝产生血纤维蛋白原, 促进血栓形<sup>[5,6]</sup>。由于脂质在血管壁沉积, 使内皮细胞受到刺激, 可导致白细胞介素 8 的分泌增加, 然后诱发一系列免疫反应, 使病变部位血管受炎症细胞的浸润<sup>[6]</sup>。白细胞介素 8 与平滑肌受体结合后, 细胞膜上 G-蛋白偶联的磷脂酰肌醇途径, 加重了血管壁平滑肌的增殖, 脂质沉着及钙化, 使冠状动脉狭窄进一步加重<sup>[6]</sup>。白细胞介素 6 尚可促进心肌细胞表达细胞间粘附分子 1, 增加嗜中性粒细胞和心肌细胞的粘附作用, 加重心肌细胞的损伤。细胞间粘附分子 1 还介导淋巴细胞聚集在损害部位, 共同促进动脉粥样硬化的慢性炎症过程<sup>[5,7]</sup>。粘附分子介导的白细胞的粘附增加还促进斑块的不稳定性, 削弱斑块处的纤维帽, 加速斑块裂隙, 最终促进斑块破裂, 血栓形成, 临床表现为不稳定性心绞痛和心肌梗死发生<sup>[7]</sup>。

寻找新的具调节功能的细胞因子是近年来一个热门课题<sup>[8]</sup>。而且人白细胞介素 17 正是在该热门课题研究中的所发现的新的免疫分子, 目前认为人白细胞介素 17 是由激活的 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞分泌, 其主要生物学活性是可以刺激多种其它细胞因子的产生, 如白细胞介素 6 和白细胞介素 8, 并使细胞表面的细胞间粘附分子 1 的表达增加<sup>[1-4]</sup>。人白细胞介素 17 受体在体内的广泛存在, 也提示人白细胞介素 17 可能具有比较重要和广泛的生物学活性<sup>[1]</sup>。为了解人白细胞介素 17 在心血管疾病的发病机制的作用。我们利用自行设计合成的人白细胞介素 17 引物, 应用反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 技术, 成功地从 PHA 活化的正常人外周血单个核细胞中扩增出全部编码区的人白细胞介素 17 cDNA, 构建了人白细胞介素 17 基因克隆, 经 DNA 序列测定, 确认为人白细胞介素 17 基因, 通过核酸杂交分析冠心病患者外周血单个核细胞人白细胞介素 17 mRNA 表

达的。证实了冠心病组人白细胞介素 17 mRNA 的表达阳性率明显高于对照组(冠心病组为 62.5%, 对照组为 14.3%), 且每个病人的表达量不同。血清可溶性细胞间粘附分子-1 水平在冠心病组人白细胞介素 17 mRNA 的表达阳性病人和阴性病人之间有显著差异, 提示冠心病病人人白细胞介素 17 mRNA 和血清可溶性细胞间粘附分子-1 密切相关。Huang 等<sup>[9]</sup>认为可溶性细胞间粘附分子-1 等血浆水平可充当动脉硬化及冠心病发展的分子标记, 说明人白细胞介素 17 在冠心病发病机制起着重要的作用。

本实验为今后在基因水平上进一步探讨人白细胞介素 17 在动脉粥样硬化等疾病发病机制中的作用, 提供了可靠的理论基础。

#### 参考文献

- [1] Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, et al. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor [J]. *Immunity*, 1995, **3**(6): 811- 821
- [2] Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, et al. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells [J]. *Immunol*, 1995, **155** (12): 5 483 - 481
- [3] Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, et al. T cell interleukin 17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines [J]. *J Exp Med*, 1996, **183** (6): 2 593- 603
- [4] Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-1beta and TNF-alpha, by human macrophage [J]. *J Immunol*, 1998, **160** (7): 3 513- 521
- [5] Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, et al. Inflammation, obesity, stress, and coronary heart disease: is interleukin 6 the link [J]? *Atherosclerosis*, 1999, **148** (2): 209- 214
- [6] Ishibashi T, Kiiima M, Yokovama K, et al. Expression of cytokine and adhesion molecule mRNA in atherectomy specimens from patients with coronary artery disease [J]. *Jpn Circ J*, 1999, **63** (4): 249 - 254
- [7] 张宇辉, 刘国仗. 粘附分子和粘附蛋白在冠心病发生发展中的应用[J]. *心血管病学进展*, 2000, **21** (2): 113- 115
- [8] Rouvier E, Luciani MF, Mattei MG, et al. CTLA- 8, cloned from an activated T cell, bearing AU- rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene [J]. *J Immunol*, 1993, **150** (12): 5 445- 456
- [9] Hwang SJ, Ballantyne CM, Richey SA, et al. Circulating adhesion molecules VCAM - 1, ICAM - 1, and E - selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: The atherosclerosis risk. In communities (ARIC) study [J]. *Circulation*, 1997, **96** (12): 4 219- 225

(此文 2000- 09- 收到, 2000- 05- 16 修回)

(此文编辑 胡必利)