

构建携带 hIL-10 基因的腺病毒载体及其对大鼠肝细胞损伤的保护作用

程 剑^{1*}, 林 彬², 沈晓洁¹, 刘 艳¹

(¹无锡卫生高等职业技术学校病理教研室,²内科教研室,江苏 无锡 214028)

[摘要] 目的:构建携带人白细胞介素(human interleukin, hIL)-10 基因的腺病毒载体,细胞学及动物模型实验鉴定其介导的目的基因表达,并验证其对大鼠肝细胞损伤的保护作用。方法:以 pORF-hIL10 质粒为模板,PCR 扩增 hIL-10 基因,插入腺病毒质粒 pDC315,构建 pDC315-hIL10。将质粒 pDC315-hIL10 与腺病毒包装质粒共转染至 293 细胞,产生复制缺陷型重组腺病毒 Ad5-hIL10;感染大鼠肝细胞,免疫学方法鉴定目的基因的表达;建立体内外大鼠肝细胞损伤模型,验证 Ad5-hIL10 对肝细胞损伤的保护作用。结果:经 PCR 扩增、鉴定,证明已正确构建重组腺病毒 Ad5-hIL10。大鼠肝细胞感染 Ad5-hIL10 后,随着病毒感染强度的升高,hIL-10 表达明显上升。大鼠肝细胞体外培养模型预先感染病毒 Ad5-hIL10,经四氯化碳诱导损伤,则细胞存活率随感染强度(multiplicity of infection, MOI)值升高而增加,至 MOI=50 时,细胞存活率恢复至 92%;大鼠体内肝损伤模型显示,与损伤对照组和空白病毒对照组比较,Ad5-hIL10 处理的大鼠肝细胞水样变性和间质炎症反应均减轻,肝功能的各项指标均有明显改善($P < 0.05$)。结论:成功构建了重组腺病毒质粒 Ad5-hIL10,且能明显提高肝细胞的存活能力,对肝功能有明显保护作用。

[关键词] 白细胞介素 10;腺病毒载体;大鼠肝损伤模型

[中图分类号] R329.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)11-1516-06

Construction of a recombinant adenovirus carrying human interleukin-10 gene and its protection effect on rat hepatocytes during liver injury

CHENG Jian^{1*}, LIN Bin², SHEN Xiao-jie¹, LIU Yan¹

(¹Department of Pathology, ²Department of Internal Medicine, the Vocational-Technical Sanitation College of Wuxi, Wuxi 214028, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a recombinant adenovirus carrying human interleukin(hIL)-10 gene and identify its expression and protection effect on rat hepatocytes during liver injury. **Methods:** The hIL-10 gene was amplified by PCR from template plasmid pORF-hIL10, then digested with endonuclease and inserted into pDC315 to recombine adenovirus Ad5-hIL10. Ad5-hIL10 was used to infect rat hepatocytes, and the hIL-10 expression was identified by immunology method. Rat hepatocyte injury model was established, and protection effect of the Ad5-hIL10 was investigated both in hepatocytes *in vitro* and rat models *in vivo*. **Results:** The recombinant adenovirus Ad5-hIL10 was recombined successfully. After infected with Ad5-hIL10, the expression level of hIL-10 in hepatocytes was increased with viral MOIs. The cell viability of virus-infected hepatocytes increased along with viral MOIs under carbon tetrachloride induction, being 92% when MOI=50. In rat model, compared with the control group and blank virus group, the hepatocyte hydropic degeneration and stroma inflammation in Ad5-hIL10-treated group were alleviated, and the liver function was improved ($P < 0.05$). **Conclusion:** The recombinant adenovirus Ad5-hIL10 has been successfully constructed, which was demonstrated to have activity of improving rat hepatocyte viability and protecting liver function.

[Key words] interleukin-10; adenovirus vector; rat liver injury model

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(11): 1516-1521]

人白细胞介素(human interleukin, hIL)-10 主要由单核细胞、巨噬细胞、T 和 B 淋巴细胞分泌, Th1

和 Th2 细胞受刺激后均可分泌, 肝内枯否细胞也可分泌, 具有重要的免疫调节功能和抗炎作用^[1], 临床应用前景广阔。研究表明, IL-10 可以抑制肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 、趋化因子和细胞间黏附分子的 mRNA 的表达, 从而减轻大鼠的肝损

[基金项目] 江苏省卫生职业技术教育研究课题(J201017)

*通讯作者, E-mail: 251810058@qq.com

伤^[2]。有研究也发现对猪的肝脏给予 IL-10 的预处理,可以降低受体的转氨酶以及减少肝的炎性细胞浸润和细胞坏死,减轻肝损伤。本研究构建了携带 hIL-10 重组腺病毒载体,在体内外细胞学实验中,研究 hIL-10 表达对肝细胞损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

pORF-hIL10 质粒(美国 Invivo Gen 公司);兔抗 hIL-10 抗体(福州迈新生物技术公司);MTT labeling reagent (美国 Roche Diagnostics 公司);四氯化碳(北京化工厂产品);hIL-10 ELISA 检测试剂盒(美国 Invitrogen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 携带 hIL-10 基因的重组腺病毒载体的构建

合成 hIL-10 基因引物,上游:5'-CCGGAATTCAC-CATGGCCCACAGCTCAGC-3', 含 *EcoR* I 酶切位点;下游:5'-CGACGTCGACTTATCAGTTTCGTATCTTC-ATTGTC-3', 含 *Sal* I 酶切位点, 扩增片段 552 bp。EGFP 引物,上游:5'-GGAAGATCTACCATGGTGAG-CAAGGGC-3', 含 *Bgl* II 酶切位点;下游:5'-TG-CACTCGAGTTATTATCTAGATCCGGTGGATC-3', 含 *Xho* I 酶切位点, 扩增片段大小 760 bp。以 pORF-hIL10 质粒为模板,PCR 扩增 hIL-10 基因 cDNA 序列, 克隆入 pUC19 载体中, 测序鉴定。将 pUC19-hIL10 酶切回收 hIL-10 cDNA 片段, 反应参数:96℃ 5 min, 95℃ 30 s 变性, 60℃ 30 s 退火, 72℃ 60 s 延伸, 共 20 个循环, 再 72℃ 10 min。扩增产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 胶回收试剂盒回收后, 克隆入 pDC315 载体, 构建 pDC315-hIL10 载体。同样方法构建含有增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的对照腺病毒载体 pDC315-EGFP。

质粒 pDC315-hIL10、pDC315-EGFP 与 5 型腺病毒骨架质粒 pBGHE3 通过 Lipofectamine 2000 共转染 293 细胞, 进行细胞内同源重组。2 周后挑取病毒噬斑, 应用 QIAamp DNA Blood Mini Kit 提取腺病毒 DNA, 经 PCR 扩增 hIL-10 或 EGFP 鉴定, 以确定重组腺病毒 DNA 中成功克隆了 hIL-10、EGFP 基因。鉴定正确后, 命名为 Ad5-hIL10 和 Ad5-EGFP。病毒在 293 细胞中反复扩增, 氯化铯梯度离心法纯化。

1.2.2 大鼠肝细胞的分离与培养

清洁级的雄性 SD 大鼠, 体重 250~300 g, 由上海斯莱克实验动物中心提供。采用二步胶原酶灌注法

分离大鼠肝细胞^[3]。将分离的肝细胞悬浮于 RPMI 1640 培养基中, 在 37℃、5%CO₂ 条件下继续培养。

1.2.3 腺病毒载体感染效率的测定

大鼠肝细胞铺 96 孔板, 1 × 10³ 个/孔, 培养 24 h; 换用无血清培养液, 以感染强度(multiplicity of infection, MOI)=1、5、10、50 加入病毒 Ad5-EGFP, 轻摇 2 h; 吸除上清, 换用含 2% 血清的培养液, 培养 48 h 后, 荧光显微镜下观察, 计数荧光表达阳性细胞比例。

1.2.4 腺病毒载体基因表达的测定

大鼠肝细胞铺 6 孔板, 5 × 10⁴ 个/孔, 培养 24 h; 换用无血清培养液, MOI=1、5、10、50 加入病毒 Ad5-hIL10, 轻摇 2 h; 吸除上清, 换用含 2% 血清的培养液, 培养 48 h。收集培养细胞上清, 采用 hIL-10 ELISA 试剂盒测定细胞上清中 hIL-10 含量, 方法参考试剂盒说明。同时收集培养细胞, 以 RT-PCR 方法鉴定 hIL-10 mRNA 表达, 以免抗 hIL-10 抗体行 Western blot 检测细胞沉淀中 hIL-10 蛋白的表达。

1.2.5 细胞损伤模型的建立及 hIL-10 表达对肝细胞损伤的保护作用

大鼠肝细胞铺 6 孔板, 5 × 10⁴ 个/孔, 培养 24 h, 分 3 组(每组设 8 个复孔)。Ad5-hIL10 感染组, 细胞贴壁后, 换用无血清培养液, MOI=1、5、10、50 加入病毒 Ad5-hIL10, 轻摇 2 h; 吸除上清, 换用含 2% 血清的培养液, 培养 24 h 后, 加入四氯化碳至终浓度 0.5 mol/L, 继续培养 24 h。Ad5-EGFP 感染组, 对照病毒 Ad5-EGFP 感染细胞, 与 Ad5-hIL10 感染组同步加入相同浓度的四氯化碳。空白对照组, 细胞同步培养, 不加病毒和四氯化碳。

通过四唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)比色实验检测细胞存活率。上述培养的细胞, 在四氯化碳作用后 24 h, 弃去培养液, 加入 0.1 mol/L PBS 溶液 100 μl/孔, 再加 MTT labeling reagent 10 μl/孔至终浓度 0.5 mg/ml, 置孵箱内 4 h; 加 Solubilization solution (10% SDS, 0.01 mol/L HCl) 100 μl/孔, 置孵箱内过夜; 酶标仪(Model 550 Microplate Reader, 美国 BIO-RAD 公司)测定 570 nm 波长吸光度值, 校正波长为 655 nm; 绘制细胞生存曲线。

1.2.6 大鼠肝损伤模型建立

健康 SD 大鼠 24 只, 雄性, 4 周龄, 体重 80~100 g (中科院上海 SLAC 实验动物中心提供, 清洁级动物实验室饲养)。实验分 4 组, 每组 6 只。Ad5-hIL10 治疗组、Ad5-EGFP 治疗组、损伤对照组(损伤后未治疗)、正常对照组。前 2 组大鼠在第 1、3、5、7、9 天经尾静脉分别注射对应病毒 Ad5-hIL10 和 Ad5-EGFP,

每次每只剂量为 5×10^8 pfu/200 μ l。后 2 组则同步注射等体积生理盐水。在第 3、5、7、9、11 天,除正常对照组外,其余大鼠全部腹腔注射含 40%四氯化碳的石蜡油溶液,每次每只 200 μ l。

1.2.7 大鼠 hIL-10 表达及肝功能检查

在大鼠肝损伤模型建立后继续饲养 4 周,大鼠下腔静脉采血,ELISA 方法检测血清 hIL-10 表达;血清生化检测总胆红素(total bilirubin, TBIL)、丙氨酸氨基转移酶(alanine transaminase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、总蛋白(total protein, TP)、白蛋白(albumin, ALB)等肝功能指标。

1.2.8 大鼠肝组织形态学检查

处死大鼠,取大鼠肝组织标本,用石蜡切片 HE 染色观察大鼠肝细胞的形态变化。

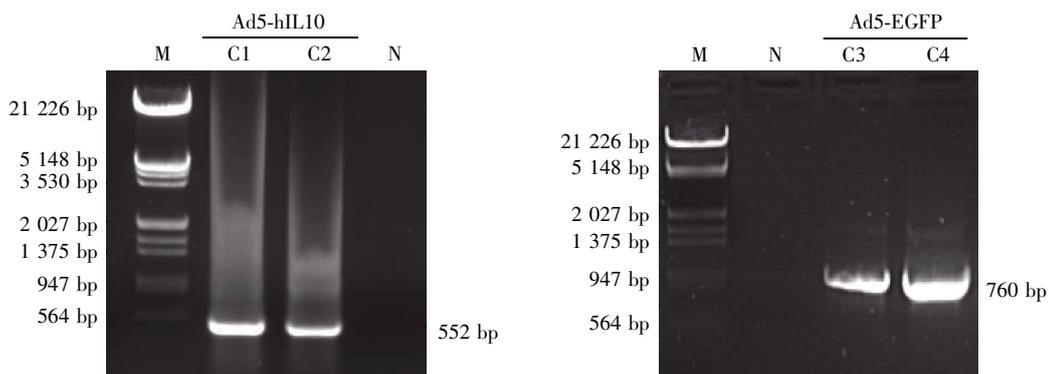
1.3 统计学方法

实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组之间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,SPSS13.0 软件包处理, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组腺病毒的鉴定

腺病毒在 293 细胞中重组,2 周后各挑取病毒噬斑 2 个,经 PCR 扩增 hIL-10 或 EGFP 鉴定,所取 2 个病毒克隆均成功克隆了 EGFP、hIL-10 基因(图 1)。



M: Lambda DNA/EcoR I +Hind III 分子量标记; N: 阴性对照; 病毒克隆 C1 和 C2 经 PCR 扩增,证实含 hIL-10; C3 和 C4 证实含 EGFP 基因序列。

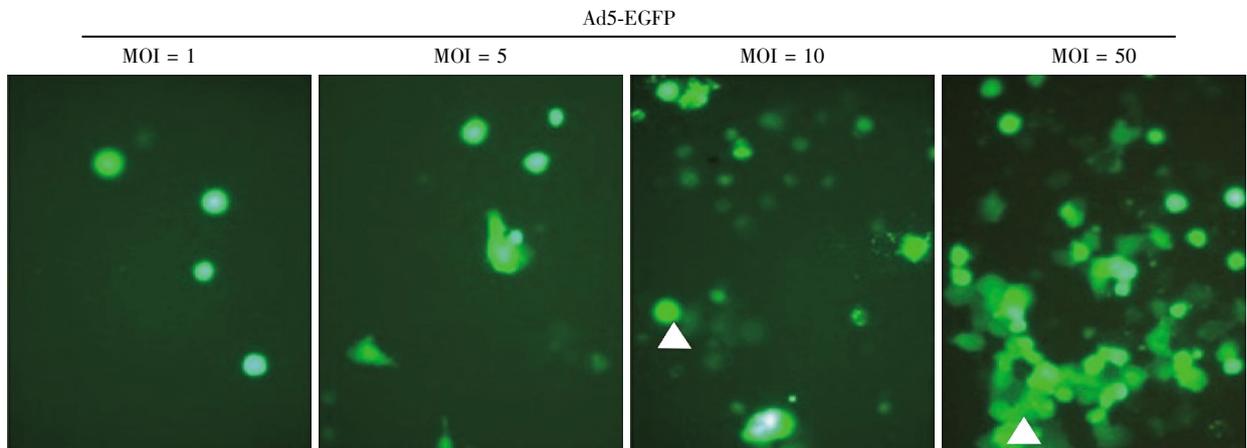
图 1 重组腺病毒克隆的鉴定

Figure 1 Identification of the recombinant adenovirus clones

2.2 腺病毒载体感染效率

大鼠肝细胞感染 Ad5-EGFP 后 48 h, 荧光显微镜下观察计数荧光表达阳性细胞比例。结果显示,

随着 MOI 值的升高,病毒感染效率也逐渐增高。在 MOI=1、5、10、50 时,EGFP 表达阳性的细胞比例分别为 15.6%、28.9%、35.6%和 56.8%(图 2)。



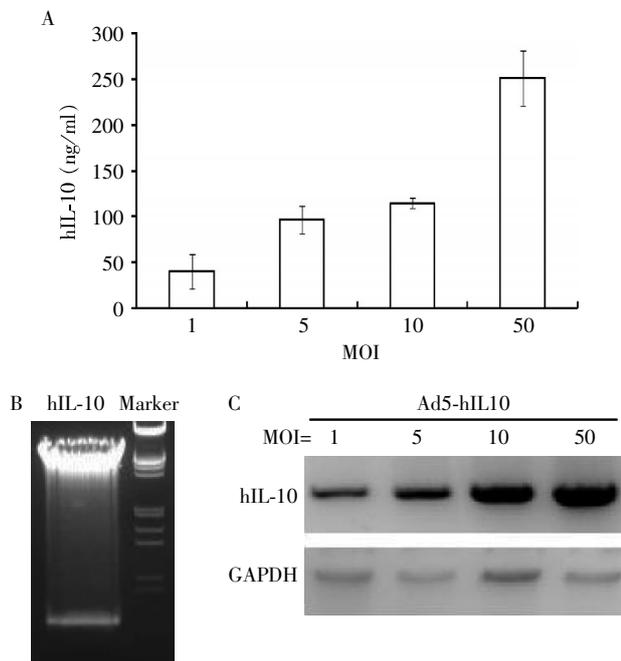
Δ 示感染 Ad5-EGFP 后呈绿色荧光反应的肝细胞。

图 2 携带 EGFP 的腺病毒感染大鼠肝细胞的效率($\times 200$)

Figure 2 Infection efficiency of adenovirus carry EGFP in rat hepatocytes ($\times 200$)

2.3 腺病毒载体基因表达

大鼠肝细胞以 MOI=1、5、10、50 的感染强度感染病毒 Ad5-hIL10, 培养 48 h 后, 分别采用 ELISA、RT-PCR 和 Western blot 测定细胞上清中 hIL-10 含量(图 3)。ELISA 结果显示, MOI=1、5、10、50 时, 细胞上清中 hIL-10 含量分别是 (39.87±18.74)、(96.03±15.12)、(114.36±5.57)、(251.23±29.97)ng/ml。RT-PCR 结果显示有明显的 hIL-10 目的条带, 大小 552 bp。Western blot 结果显示, 随着病毒感染强度的升高, hIL-10 表达明显上升。



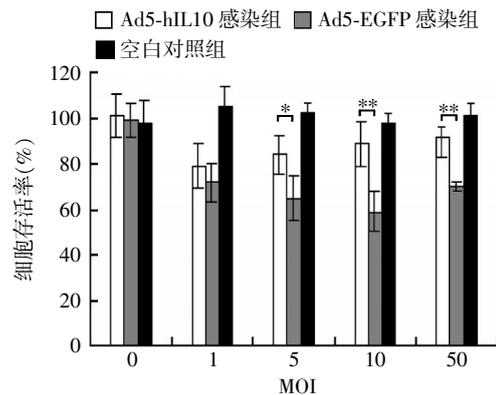
A: ELISA 检测细胞培养上清中 hIL-10 表达量; B: RT-PCR 检测感染 Ad5-hIL10 的大鼠肝细胞中 IL-10 基因的表达; C: Western blot 检测不同 MOI 感染大鼠肝细胞后 hIL-10 的蛋白表达情况。

图 3 腺病毒载体介导 hIL-10 基因在大鼠肝细胞中的表达
Figure 3 Expression of hIL-10 gene in rat hepatocytes mediated by adenovirus

2.4 hIL-10 表达对四氯化碳诱导的大鼠肝细胞损伤的保护作用

大鼠肝细胞加入四氯化碳至终浓度 0.5 mol/L 后, 细胞出现明显的损伤, 细胞存活率下降至 59%~72%, 与空白对照组相比, 差异具有显著性 ($P < 0.01, n = 8$)。当细胞预先以 MOI=1、5、10、50 的感染强度感染病毒 Ad5-hIL10, 再加四氯化碳诱导剂, 则细胞存活率随 MOI 值的升高而增加, 当 MOI=5、10、50 时, Ad5-hIL10 感染组的细胞存活率与 Ad5-EGFP 感染组相比, 差异均有统计学意义。MOI=50 时, 细胞存活率恢复至 92%(图 4)。

2.5 大鼠体内血清 hIL-10 表达

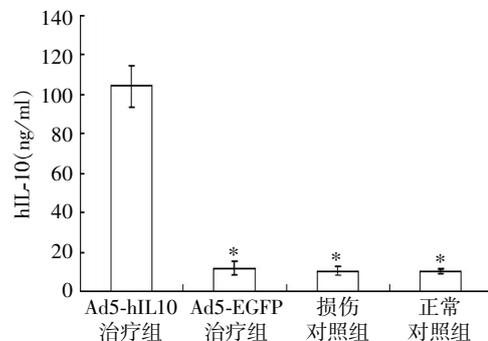


Ad5-hIL10 感染组与 Ad5-EGFP 感染组比较, $*P < 0.05, **P < 0.01, n = 8$ 。

图 4 Ad5-hIL10 表达对四氯化碳诱导的大鼠肝细胞存活率的影响

Figure 4 Effect of Ad5-hIL10 on rat hepatocyte viability injured by carbon tetrachloride

ELISA 方法检测 4 组大鼠血清 hIL-10 表达分别为 (104.07 ± 10.64)、(11.68 ± 3.28)、(10.35 ± 2.06)、(10.13 ± 1.45)ng/ml, Ad5-hIL10 组血清 hIL-10 表达显著升高, 与其余 3 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01, n = 6$)。结果证实所构建的重组腺病毒 Ad5-hIL10 能在大鼠体内高水平表达(图 5)。



与 Ad5-hIL10 治疗组比较, $*P < 0.01$ 。

图 5 大鼠体内血清 hIL-10 表达

Figure 5 Expression of serum hIL-10 in rat liver

2.6 实验大鼠肝功能检查

各组大鼠采血, 常规血清生化学检测血 TBIL、ALT、AST、TP、ALB 5 项肝功能指标 (表 1)。可见 Ad5-hIL10 治疗组与损伤对照组相比, 所有 5 项指标差异均有统计学意义 (TBIL、TP: $P < 0.05$; ALT、AST、ALB: $P < 0.01$); Ad5-hIL10 治疗组和 Ad5-EGFP 组相比, 在除 TP 外的其他 4 项指标差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 证明预先用 IL-10 保护大鼠肝脏, 可以明显降低四氯化碳对大鼠肝细胞的损伤, 对肝功能有明显的保护作用, 能够降低大鼠的总胆红素和转氨酶, 提高白蛋白和总蛋白。Ad5-

hIL10 治疗组和 Ad5-EGFP 治疗组相比,TP 虽然没有统计学意义,但也可见明显增高。Ad5-hIL10 治疗组与正常对照组相比,TBIL 和 AST 有明显升高 ($P < 0.01$),ALT 略有升高,TP、ALB 略有下降 ($P > 0.05$),说明虽然有 IL-10 的保护,但未能使肝功能完全恢

复到正常,四氯化碳对大鼠肝功能仍有一定影响。另外,Ad5-EGFP 治疗组、损伤对照组的各项指标变化均一致 ($P > 0.05$),且与正常对照组比较有明显差异 ($P < 0.01$),证明病毒空载体 Ad5-EGFP 对肝细胞没有保护作用。

表 1 大鼠肝功能检查结果

Table 1 Results of rat liver function test

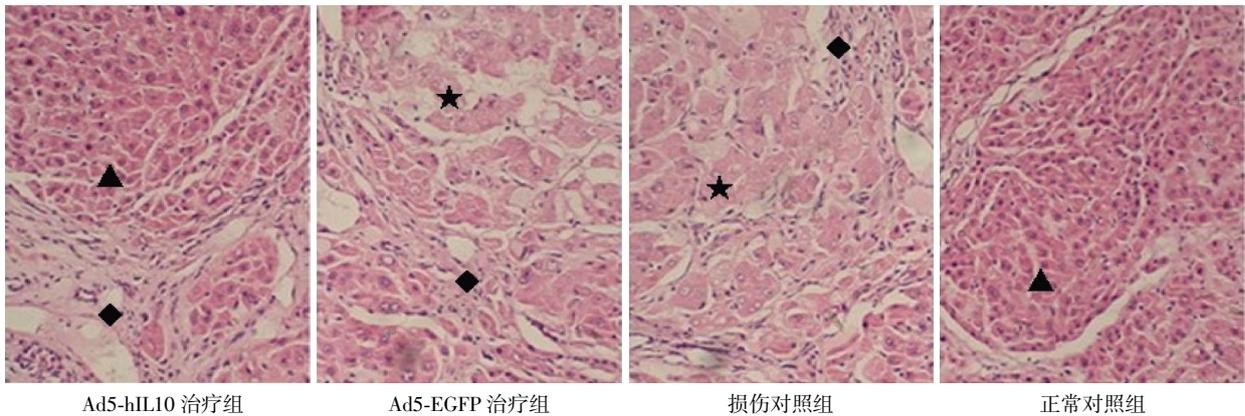
组别	TBIL($\mu\text{mol/L}$)	ALT(U/L)	AST(U/L)	TP(g/L)	ALB(g/L)
Ad5-hIL10 治疗组	11.30 \pm 2.28 $^{\Delta}$	142.17 \pm 120.76	310.17 \pm 86.25 $^{\Delta}$	65.75 \pm 7.56	32.32 \pm 2.52
Ad5-EGFP 治疗组	21.60 \pm 7.54 $^{**\Delta}$	886.67 \pm 254.39 $^{**\Delta}$	1 999.17 \pm 497.49 $^{**\Delta}$	55.05 \pm 12.96 $^{\Delta}$	25.88 \pm 3.80 $^{**\Delta}$
损伤对照组	22.60 \pm 9.48 $^{*\Delta}$	778.83 \pm 168.61 $^{**\Delta}$	2 309.00 \pm 779.05 $^{**\Delta}$	57.12 \pm 5.03 $^{*\Delta}$	24.72 \pm 3.44 $^{**\Delta}$
正常大鼠	1.12 \pm 0.40 **	62.50 \pm 17.72	137.33 \pm 18.33 **	73.00 \pm 5.16	34.97 \pm 2.13

与 Ad5-hIL10 治疗组相比, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与正常对照组比较, $^{\Delta}P < 0.01$ ($n = 6$)。

2.7 大鼠肝组织病理检查

观察期结束,处死大鼠,取大鼠肝组织,常规石蜡切片 HE 染色(图 6),可见 Ad5-hIL10 治疗组与正常对照组大鼠肝细胞相似,肝细胞大小形态正常,细胞核大小正常,核膜清楚,胞浆丰富,染色正

常,但 Ad5-hIL10 治疗组汇管区增宽且可见炎症细胞浸润。Ad5-EGFP 治疗组和损伤对照组大鼠肝细胞则出现明显细胞肿胀、染色淡,细胞核消失,细胞膜不清晰,可见碎片样、桥接样坏死,坏死区有炎细胞浸润。



▲示正常的肝细胞,★示水肿的肝细胞,◆示炎细胞浸润。

图 6 大鼠肝细胞形态学观察(HE, $\times 200$)

Figure 6 Morphological changes of rat hepatocytes (HE, $\times 200$)

3 讨论

肝炎、肝炎后肝硬化以及肝脏外科手术、肝移植都存在肝细胞损伤,如何减轻肝细胞损伤,保护肝功能,成为肝脏病治疗中需要面对的问题。通过基因治疗手段来预防和减轻肝损伤是近年来人们研究的一个新方法^[4-6]。

IL-10 是一种多效应的细胞因子,它的主要功能就是限制和终止炎症反应^[7]。IL-10 最初于 1989 年发现,由 Th2 分泌,能抑制 Th1 细胞因子的分泌,对细胞免疫和体液免疫及炎症过程均有广泛影响^[8-9]。近年来的研究证实,IL-10 主要参与 T 淋巴细胞免

疫调节,抑制 T 淋巴细胞激活,诱导 T 淋巴细胞免疫耐受,抑制抗体依赖性 T 淋巴细胞的增生^[10];促进 B 淋巴细胞激活及其抗体分泌^[11];抑制单核巨噬细胞的激活及其细胞因子的分泌^[12];抑制前炎性细胞因子分泌^[13]。总之,IL-10 是一种生物学作用广泛的细胞因子,IL-10 可通过抑制前炎性细胞因子的分泌、抑制中性粒细胞的激活与其黏附分子的表达等机制^[1-2],来抑制肝损伤时的急性期增殖反应和肝纤维化的发生^[14]。

本研究建立一种针对肝损伤免疫反应调节机制的基因治疗方法,以腺病毒为载体携带 hIL-10 基因,通过分离培养大鼠肝细胞,转染 Ad5-hIL10 腺病毒,

结果显示该腺病毒载体可以高效率感染肝细胞,并表达其携带的外源基因 hIL-10,为外源基因行使生物学功能奠定了良好的基础。在此基础上,建立四氯化碳诱导的大鼠肝细胞损伤的细胞模型和动物模型,采用 Ad5-hIL10 腺病毒进行预防性干预,发现 hIL-10 的表达不但可以在体外有效预防肝细胞损伤,提高肝细胞在损伤诱导剂存在情况下的存活率,而且体内实验各项肝功能指标检测也提示,Ad5-hIL10 治疗组肝功能虽有一定程度改变,但和实验对照组相比有明显的改善,尤其能明显降低转氨酶,保护大鼠肝功能不受四氯化碳损伤。肝组织病理切片证实,Ad5-hIL10 治疗组肝细胞形态基本接近正常,无明显变性、坏死,细胞水肿,炎症反应亦较轻。本实验证实,IL-10 对肝细胞损伤有保护作用,可以通过体内的免疫调节途径,在体外也可以通过某种机制发挥保护效应。本研究构建的携带 hIL-10 基因的腺病毒载体在肝病领域中有很大的应用潜力,有望成为肝损伤基因治疗的新策略。而且该系统与其他治疗方法相比,没有明显不良反应,可能成为预防肝细胞损伤的综合治疗方案之一。

[参考文献]

- [1] Pestka S, Krause CD, Sarkar D, et al. Interleukin-10 and related cytokines and receptors[J]. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22(3): 929-979
- [2] Si ZZ, Li JQ, Qi HZ, et al. Recombinant adenovirus vector Ad-hIL-10 protects grafts from cold ischemia-reperfusion injury following orthotopic liver transplantation in rats[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2010, 9(2): 144-148
- [3] Shen L, Hillebrand A, Wang DQ, et al. Isolation and primary culture of rat hepatic cells[J]. *J Vis Exp*, 2012, 29(64): 3917
- [4] Qiu H, Yan Y, Xing J, et al. Adenovirus-mediated dual gene expression of human interleukin-10 and hepatic growth factor exerts protective effect against CCl₄-induced hepatocyte injury in rats[J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(7): 1857-1865
- [5] Pachkoria K, Lucena MI, Crespo E, et al. Analysis of IL-10, IL-4 and TNF-alpha polymorphisms in drug-induced liver injury (DILI) and its outcome[J]. *J Hepatol*, 2008, 49(1): 107-114
- [6] Mandal P, Pritchard MT, Nagy LE. Anti-inflammatory pathways and alcoholic liver disease: role of an adiponectin/interleukin-10/heme oxygenase-1 pathway[J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(11): 1330-1336
- [7] Kiyota T, Ingraham KL, Swan RJ, et al. AAV serotype 2/1-mediated gene delivery of anti-inflammatory interleukin-10 enhances neurogenesis and cognitive function in APP+PS1 mice[J]. *Gene Ther*, 2012, 19(7): 724-733
- [8] Andreoli CG, Genro VK, Souza CA, et al. T helper (Th) 1, Th2, and Th17 interleukin pathways in infertile patients with minimal/mild endometriosis[J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(8): 2477-2480
- [9] Kosaka S, Tamauchi H, Terashima M, et al. IL-10 controls Th2-type cytokine production and eosinophil infiltration in a mouse model of allergic airway inflammation[J]. *Immunobiology*, 2011, 216(7): 811-820
- [10] Cui HD, Qi ZM, Yang LL, et al. Interleukin-10 receptor expression and signalling were down-regulated in CD4 (+) T cells of lupus nephritis patients[J]. *Clin Exp Immunol*, 2011, 165(2): 163-171
- [11] Bouaziz JD, Calbo S, Maho-Vaillant M, et al. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4 (+) T-cell activation *in vitro* [J]. *Eur J Immunol*, 2010, 40(10): 2686-2691
- [12] Chávez-Sánchez L, Chávez-Rueda K, Legorreta-Haquet MV, et al. The activation of CD14, TLR4, and TLR2 by mmLDL induces IL-1 β , IL-6, and IL-10 secretion in human monocytes and macrophages[J]. *Lipids Health Dis*, 2010, 9(1): 117
- [13] He Z, Xiao M, Guo Q. IL-10 overexpression at attenuated expression of TNF- α and IL-1 β activated by lipopolysaccharide in astrocytes[J]. *J Cent South Univ (Med Sci)*, 2011, 36(5): 392-397
- [14] Hrcakova G, Velebný S, Solár P. Dynamics of hepatic stellate cells, collagen types I and III synthesis and gene expression of selected cytokines during hepatic fibrogenesis following *Mesocestoides vogae* (Cestoda) infection in mice [J]. *Int J Parasitol*, 2010, 40(2): 163-174

[收稿日期] 2012-08-31