文章编号:1000-5404(2013)10-0927-04

论著

CpG-c41分子对TLR7-MyD88依赖型信号通路的交叉干扰作用

陈 铭,卫 国,祝元锋,沈 伟,李 彦 (400038 重庆,第三军医大学西南医院综合实验研究中心)

[摘要] **目的** 探讨TLR9强力拮抗剂CpG-c41分子对TLR7-MyD88依赖型信号通路的交叉干扰作用。**方法** 体外实验采用ELISA法检测CpG-c41对TLR7激动剂ssRNA83刺激RAW264.7细胞24 h诱发的炎症介质TNF-α和IL-6表达的影响,Western blot检测CpG-c41对TLR7-MyD88依赖型信号通路中IκBα蛋白表达的影响;体内实验采用ELISA法检测CpG-c41对ssRNA83攻击BALB/c小鼠2 h诱发血清中TNF-α和IL-6表达的影响作用。**结果** 体内、体外实验均表明,CpG-c41分子能够显著抑制经ssRNA83刺激诱发TLR7-MyD88依赖型信号通路介导的炎症介质TNF-α和IL-6的释放($P<0.01$),体外实验表明抑制作用具有量效关系;而Western blot检测显示在CpG-c41作用下,TLR7-MyD88依赖型信号通路中IκBα的降解受干扰。**结论** TLR9强力拮抗剂CpG-c41分子通过干扰TLR7-MyD88依赖型信号通路中IκBα的磷酸化降解,抑制炎症介质的释放,发挥对ssRNA攻击小鼠的免疫保护作用。

[关键词] CpG-c41;ssRNA83;TLR7-MyD88依赖型信号通路;交叉干扰
[中图法分类号] R329-33;R392.1;R392.32 [文献标志码] A

Cross-interference of CpG-c41 on TLR7-MyD88-dependent pathway

Chen Ming, Wei Guo, Zhu Yuanfeng, Shen Wei, Li Yan (Medical Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the cross-interference effect of toll-like receptor 9 (TLR9) antagonist CpG-c41 on TLR7-MyD88-dependent pathway. **Methods** The levels of TNF-α and IL-6 in the supernatants of RAW264.7 cells (supplied with CpG-c41 simultaneously) treated with TLR7 agonist ssRNA83 were measured by ELISA at 24 h, and IκBα expression mediated by TLR7-MyD88-dependent pathway was assayed by Western blotting. CpG-c41-mediated immune protection of ssRNA83 attacked BALB/c mice was observed according to detection of serum levels of TNF-α and IL-6 by ELISA at 2 h. **Results** The results of *in vitro* and *in vivo* experiments demonstrated that the expression levels of TNF-α and IL-6 were all significantly inhibited ($P<0.01$). The results of *in vitro* experiment showed a dose-dependent inhibition, and Western blotting results showed that CpG-c41 could interfere with the degradation of IκBα mediated by TLR7-MyD88-dependent pathway. **Conclusion** CpG-c41 has a cross-interference effect on the degradation of IκBα mediated by TLR7-MyD88-dependent pathway, which consequently inhibits the release of pro-inflammatory cytokines, and protects mice against ssRNA attacking.

[**Key words**] CpG-c41; ssRNA83; TLR7-MyD88-dependent pathway; cross-interference

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2013jjb0128). Corresponding author: Li Yan, E-mail: liyan.com@gmail.com

Toll样受体(Toll-like receptors,TLRs)作为机体固有免疫系统中特异性识别结合外源性/内源性病原相关模式分子(pathogen-associated molecular patterns,PAMPs)的一类主要模式识别受体(pattern recognition receptors,PRRs),依据其在细胞内位置分布不同分为胞膜型和内膜型TLRs[1-2]。不同TLRs识别相应PAMPs后,经下游信号通路转导诱发炎症因子表达,从而激发宿主免疫应答。而病原体感染往往会激发机体多种TLRs依赖的信号通路,不同TLRs通路间既相互独立又彼此交汇,交汇时往往表现出复杂的叠加、协同或拮抗等交互效应[3-4]。正常情况下,TLRs通路间的交互作用对于维持机体正常免疫应答有重要作用;异常时却会导致免疫系统调节功能紊乱,许多自身免疫性疾病(如类风湿关节炎、系统性红斑狼疮)的发生、发展被证明与之有密切关系[5-6]。

在已发现的多种TLR中,TLR7、9均分布于免疫细胞内体,其中,TLR7特异性识别单链RNA,TLR9特异性识别微生物非甲基化CpG-DNA片段。研究[7]表明,同时活化的TLR9与TLR7通路在交互作用时表现拮抗效应,但作用机制尚不完全清楚。而TLR7通路

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2013jjb0128)
[通信作者] 李 彦,E-mail:liyan.com@gmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130228.1714.007.html(2013-02-28)

诱发的炎症反应和许多自身免疫性疾病的发生、发展有重要关系，抑制其炎症效应可缓解自身免疫性疾病[8-9]。因此，明确 TLR9 与 TLR7 通路间的交互作用机制具有重要意义。

以往普遍认为病原体 CpG-DNA 具有免疫刺激性，被 TLR9 识别内化后，经 TLR9-MyD88 通路快速致炎，而后发现 CpG-DNA 具有异质性，分为刺激性和非刺激性 CpG-DNA[10]。而 CpG-c41 分子是我们课题组进行高通量 TLR 相关炎症研究过程中发现的无免疫刺激性 CpG-DNA 片段，它能通过竞争性结合 TLR9 受体阻断其他强刺激性 CpG-DNA 诱发的免疫学效应[11]。TLR7 激动剂 ssRNA83 是我们课题组在全基因组序列中通过生物信息学方法得到的富含 GU 片段的 ssRNA 分子，它有较传统强刺激性 ssRNA40 更显著的免疫刺激能力，可诱发炎症因子高表达[12]。

不同以往基于活化的 TLRs 信号通路间的交互作用研究，本研究从全新角度出发，在 CpG-c41 诱导 TLR9 形成无刺激性内化状态下，采用 ssRNA83 活化 TLR7 通路，观察 TLR9 无刺激性内化状态对活化的 TLR7 通路的炎症交互影响，及 TLR7 通路中信号分子的表达变化，明确 TLR9 通路对 TLR7 通路的交互作用机制，为寻找新的抗炎治疗措施奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

CpG-c41 和 ssRNA83 由上海生工合成；DOTAP 为瑞士 Roche 公司产品；小鼠 TNF-α 的 ELISA 检测试剂盒（批号 E09483-1634）和 IL-6 的 ELISA 检测试剂盒（批号 E09362-1638）均购自美国 eBioScience 公司；IκBα 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司；小鼠 RAW264.7 细胞购自美国 ATCC 公司；ImmunowashTM 微型洗板机、Mini-protean tetra 电泳仪、半干转印仪、ChemiDoc 化学发光成像系统：美国 Bio-Rad 公司；Varioskan Flash 酶联分析仪：美国 Thermo 公司。

1.2 实验动物

8 周龄 BALB/c 小鼠 20 只，体质量 18～20 g，雌性，购于第三军医大学实验动物中心，饲养于西南医院中心实验室 SPF 级动物实验室。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 培养于含 10% 热灭活 FBS、100 KU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基中，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。

1.3.2 ELISA 检测细胞培养上清 TNF-α 和 IL-6 的表达 取对数生长期的 RAW264.7 细胞，以 1×10^6/mL 浓度接种于 96 孔培养板，200 μL/孔。按实验设计分成 8 组（4 复孔/组）：①空白对照组：以 PBS 处理作为空白对照组；②CpG-c41 组：2 μmol/L CpG-c41 处理；③DOTAP 组：25 μL/mL DOTAP 处理；④ssRNA83 组：5 μg/mL ssRNA83 处理；⑤ssRNA83/CpG-c41（0.25 μmol/L）组：5 μg/mL ssRNA83 和 0.25 μmol/L CpG-c41 同时处理；⑥ssRNA83/ CpG-c41（0.5 μmol/L）组：5 μg/mL ssRNA83 和 0.5 μmol/L CpG-c41 同时处理；⑦ssRNA83/CpG-c41（1 μmol/L）组：5 μg/mL ssRNA83 和 1 μmol/L CpG-c41 同时处理；⑧ssRNA83/CpG-c41（2 μmol/L）组：5 μg/mL ssRNA83 和 2 μmol/L CpG-c41 同时处理。2 h 贴壁后，各组细胞在不同处理因素作用 24 h 后收获细胞培养上清。严格按照 ELISA 检测试剂盒的说明操作，酶标仪 450 nm 波长下测定其光密度值，并根据梯度浓度标准品建立的标准曲线计算细胞培养上清中 TNF-α 和 IL-6 的蛋白表达量。

1.3.3 Western blot 检测 IκBα 的表达 取对数生长期的 RAW264.7 细胞，按 5 mL/瓶接种 2×10^5/mL 浓度细胞悬液于 25 cm^2 的培养瓶，按分组接种 5 瓶后标号注明，共分为 5 组：①空白对照组；②2 μmol/L CpG-c41 组；③125 μL/mL DOTAP 组；④25 μg/mL ssRNA83 联合 2 μmol/L CpG-c41 组；⑤25 μg/mL ssRNA83 组。2 h 贴壁后，对应分组处理 RAW264.7 细胞，置于培养箱中培养。培养 30 min 后，弃培养基，PBS 洗涤 2 次后细胞刮轻轻刮下细胞至洁净 EP 管，1 000 r/min 4 ℃离心 5 min。每管加入预冷细胞裂解液 500 μL，冰浴中反复吹打裂解，12 000 r/min 4 ℃离心 15 min，取上清；蛋白定量后取 30 μg 蛋白质行 10% SDS-PAGE；转 PVDF 膜后，TBST 洗膜 5 min，弃废液后加 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h；TBST 洗膜 3 次，10 min/次；加一抗 4 ℃过夜；TBST 洗膜 3 次，10 min/次；加二抗，37 ℃孵育 1 h，TBST 洗膜 3 次，10 min/次；加入 ECL 显色液，置于 ChemiDoc 化学发光成像系统中观察并分析结果，同时小鼠 β-actin作为内参照。

1.3.4 ELISA 检测小鼠血清 TNF-α 和 IL-6 的表达 将小鼠用随机数字法随机分为 4 组（$n=5$）：①正常对照组（注射无菌生理盐水）；②4 mg/kg CpG-c41 组；③1 mg/kg ssRNA83 组；④1 mg/kg ssRNA83 + 4 mg/kg CpG-c41 组。

所有小鼠经尾静脉注射 300 μL 50 mg/mL 无菌生理盐水配制的 D-GalN，增敏 1 h；增敏 1 h 后，对应分组给予注射，均经尾静脉注射。其中，正常对照组注射 300 μL DOTAP + HBS（DOTAP: HBS = 1∶3）混合液，4 mg/kg CpG-c41 组注射 42 μmol/L CpG-c41 300 μL，1 mg/kg ssRNA83 组每只小鼠注射 18 μL 1 μg/μL ssRNA83 +（90 μL DOTAP + 192 μL HBS）混合液 300 μL，而 4 mg/kg CpG-c41 联合 1 mg/kg ssRNA83 作用组小鼠则每只注射 42 μmol/L CpG-c41 300 μL + 18 μL 1 μg/μL ssRNA83 +（90 μL DOTAP + 192 μL HBS）300 μL。注射后 2 h，经小鼠眶后静脉取血至洁净促凝管，静置 30 min 后，3 000 r/min 离心 10 min，取血清至洁净 EP 管，ELISA 法检测血清中 TNF-α 和 IL-6 的蛋白表达量。

1.4 统计学分析

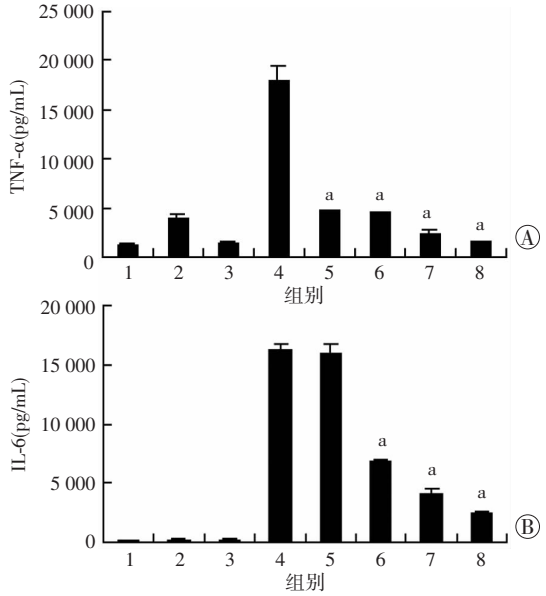
数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，所有数据应用 EXCEL 软件进行分析。试验数据组间差异比较采用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 CpG-c41 对 ssRNA83 刺激 RAW264.7 细胞释放 TNF-α 和 IL-6 的抑制作用

5 μg/mL ssRNA83 刺激组较空白对照组，TNF-α 和 IL-6 释放量显著增加（$P<0.01$），而梯度剂量（0.25、0.5、1、2 μmol/L）CpG-c41 的加入则抑制经 ssRNA83 刺激诱发的 TNF-α 和 IL-6 表达（$P<0.01$，图 1），且抑制作用呈量效关系。表明 CpG-c41 分子诱导

形成的 TLR9 无刺激性内化能够交叉干扰 TLR7 信号通路,抑制其诱发的炎症介质表达。



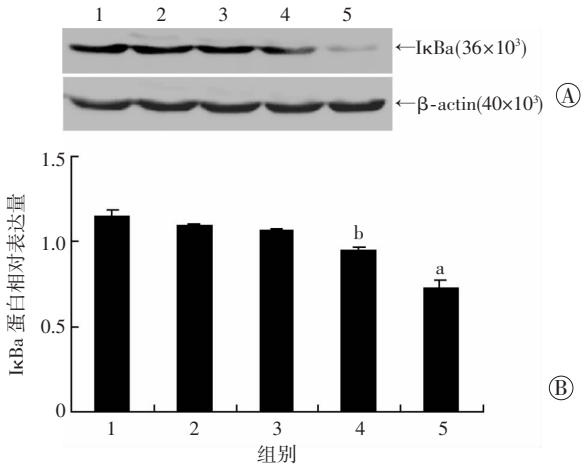
1:空白对照组;2:2 μmol/L CpG-c41 组;3:25 μL/mL DOTAP 组;4:5 μg/mL ssRNA83 组;5:5 μg/mL ssRNA83 + 0.25 μmol/L CpG-c41 组;6:5 μg/mL ssRNA83 +0.5 μmol/L CpG-c41 组;7:5 μg/mL ssRNA83 +1 μmol/L CpG-c41 组;8:5 μg/mL ssRNA83 +2 μmol/L CpG-c41 组;a: $P<0.01$, 与 5 μg/mL ssRNA83 组比较

A:TNF-α 表达;B:IL-6 表达

图 1　CpG-c41 对 ssRNA83 刺激 RAW264.7 细胞分泌炎症介质的抑制作用

2.2　CpG-c41 抑制 TLR7 信号通路中 IκBα 的活化

ssRNA83 组 IκBα 蛋白表达显著低于空白对照组($P<0.01$),提示 ssRNA83 刺激活化 RAW264.7 细胞 TLR7 通路,IκBα 大量降解。而 ssRNA83 联合 CpG-c41 组 IκBα 的蛋白表达显著高于 ssRNA83 组($P<0.01$,图 2),表明 CpG-c41 能干扰 TLR7 通路中 IκBα 的降解,从而影响后续炎症因子的释放。



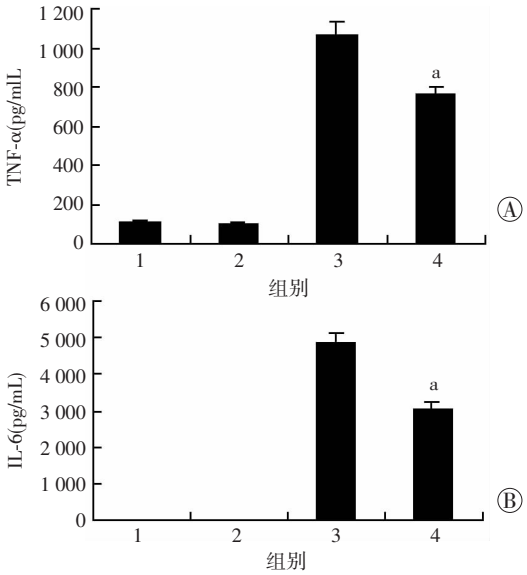
1:空白对照组;2:2 μmol/mL CpG-c41 组;3:125 μL/mL DOTAP 组;4:25 μg/mL ssRNA83 + 2 μmol/mL CpG-c41 组;5:25 μg/mL ssRNA83组;a: $P<0.01$, 与空白对照组比较;b: $P<0.01$, 与 25 μg/mL ssRNA83 组比较

A:Western blot 检测 IκBα 蛋白表达;B:IκBα 蛋白半定量分析

图 2　Western blot 检测 CpG-c41 对 ssRNA83 刺激 RAW264.7 细胞 IκBα 蛋白表达的影响作用

2.3　CpG-c41 对 ssRNA83 攻击小鼠的免疫保护作用

2 h 的血清炎症因子检测结果显示,1 mg/kg ssRNA83 联合 4 mg/kg CpG-c41 组与 1 mg/kg ssRNA83 组比较,前者小鼠血清中 TNF-α 和 IL-6 释放量显著降低($P<0.01$,图 3),表明 CpG-c41 对 ssRNA83 攻击小鼠具有免疫保护作用,能够抑制 ssRNA83 攻击诱发的炎症介质释放。



1:正常对照组;2:4 mg/kg CpG-c41 组;3:1 mg/kg ssRNA83 组;4:1 mg/kg ssRNA83 组 +4 mg/kg CpG-c41;a: $P<0.01$, 与 1 mg/kg ssRNA83 组比较

A:TNF-α 表达;B:IL-6 表达

图 3　CpG-c41 对 ssRNA83 攻击小鼠血清中炎症介质分泌的抑制作用

3　讨论

TLRs 对机体维持固有免疫具有重要作用,多种 PAMPs 往往共同参与 TLRs 信号通路的活化,引发信号交互,其对于维持机体免疫系统调节功能的正常运行具有重要作用。因此,TLRs 通路的交互作用研究成为免疫学领域的研究热点[13]。

TLR7 是特异性识别结合 ssRNA 的内膜型 TLR,静息态细胞中,IκBα 结合在 NF-κB 上使之呈非活化状态,但当 TLR7 识别配体后,胞外信号经膜受体转导至胞内,活化形成包括 IKKα、IKKβ 和 IKKγ 的高分子量复合体,后者磷酸化 IκBα,磷酸化的 IκBα 泛素化后发生降解,解除对 NF-κB 的抑制作用,游离的 NF-κB 转位入核,启动相关基因的转录表达,诱发炎症因子 TNF-α、IL-6 等的释放[14-15],调控免疫反应。而 TLR7 诱导的炎症反应与许多自身免疫性疾病,如类风湿关节炎的发生发展有密切关系[16],寻找抑制 TLR7 通路诱发的炎症效应对自身免疫性疾病治疗具有重要意义。

以往对于 TLRs 通路的交互作用研究都是基于活

化的TLRs通路进行,交互机制尚不完全清楚。本研究不同于以往研究,采用课题组新发现的CpG-c41分子诱导TLR9形成无免疫刺激性内化状态,观察其对活化的TLR7通路诱发的炎症效应的影响。基于本课题组前期研究成果[11],CpG-c41分子对RAW264.7细胞不具有细胞毒性和免疫刺激性。而本研究发现CpG-c41分子能显著抑制经TLR7通路诱发的TNF-α和IL-6的表达,且抑制作用呈现量效关系;体内实验则明确CpG-c41对ssRNA83攻击小鼠的免疫保护作用,能显著抑制经TLR7通路诱发的TNF-α和IL-6的大量释放,表明CpG-c41诱导TLR9无刺激性内化状态能够显著抑制经TLR7通路诱发的炎症介质释放。

以往研究表明,TLR9与TLR7通路同时活化时表现出拮抗的交互效应。CpG-c41作为TLR9特异性配体,经直接加入细胞,即无配体内化处理过程诱导TLR9无刺激性内化,ssRNA在本研究中经配体内化处理后入胞活化TLR7通路,结果证明CpG-c41诱导的TLR9无刺激性内化能够抑制TLR7通路诱发的炎症因子释放,表明CpG-c41是通过诱导的TLR9无刺激性内化交叉干扰TLR7通路的炎症效应,而非上游配体对受体的竞争结合导致的抑制效应。同时,结果还表明TLR9通路对TLR7通路的交叉干扰与TLR9通路的活化状态无关,无刺激性TLR9内化同样可以干扰TLR7通路诱发的炎症反应,提示干扰靶点可能位于通路上游。同时,本研究Western blot检测结果进一步表明,CpG-c41能够干扰TLR7通路IκBα蛋白的大量降解,提示CpG-c41诱导TLR9无刺激性内化状态通过干扰TLR7信号通路的上游部分,抑制TLR7-MyD88依赖的信号传导途径中IκBα的磷酸化降解,由此影响TLR7活化介导的炎症因子释放。

综上所述,CpG-c41作为机制明确的TLR9强力拮抗剂,其诱导的TLR9无刺激性内化状态通过交叉干扰TLR7-MyD88依赖的信号传导途径中IκBα的磷酸化降解干扰NF-κB活化入核,影响下游基因表达,抑制炎症介质TNF-α和IL-6的释放。本研究提示了CpG-c41分子阻断或显著抑制多种病原模式分子诱发的免疫学效应的能力,下一步计划开展CpG-c41分子对其他TLRs信号通路的影响作用研究,为全面揭示CpG-c41分子在未来抗炎抗过敏中的应用价值提供实验依据。

参考文献:

[1] Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity[J]. J Mol Med, 2006, 84(9): 712-725.

[2] Desai S V, Love R M, Rich A M, *et al*. Antigen recognition and presentation in periapical tissues: a role for TLR expressing cells? [J]. Int Endod J, 2011, 44(2): 87-99.

[3] Ghosh T K, Mickelson D J, Solberg J C, *et al*. TLR-TLR cross talk in human PBMC resulting in synergistic and antagonistic regulation of type-1 and 2 interferons, IL-12 and TNF-alpha[J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7(8): 1111-1121.

[4] Brown J, Wang H, Hajishengallis G N, *et al*. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk[J]. J Dent Res, 2009, 90(4): 417-427.

[5] Roelofs M F, Wenink M H, Brentano F, *et al*. Type I interferons might form the link between Toll-like receptor (TLR) 3/7 and TLR4-mediated synovial inflammation in rheumatoid arthritis (RA)[J]. Ann Rheum Dis, 2009, 68(9): 1486-1493.

[6] Celhar T, Magalhaes R, Fairhurst A M. TLR7 and TLR9 in SLE: when sensing self goes wrong[J]. Immunol Res, 2012, 53(1/3): 58-77.

[7] Berghofer B, Haley G, Frommer T, *et al*. Natural and synthetic TLR7 ligands inhibit CpG-A- and CpG-C-oligodeoxynucleotide-induced IFN-alpha production[J]. J Immunol, 2007, 178(7): 4072-4079.

[8] Drexler S K, Sacre S M, Foxwell B M. Toll-like receptors: a new target in rheumatoid arthritis? [J]. Expert Rev Clin Immunol, 2006, 2(4): 585-599.

[9] Walsh E R, Pisitkun P, Voynova E, *et al*. Dual signaling by innate and adaptive immune receptors is required for TLR7-induced B-cell-mediated autoimmunity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(40): 16276-16281.

[10] Klinman D M, Takeshita F, Gursel I, *et al*. CpG DNA: recognition by and activation of monocytes[J]. Microbes Infect, 2002, 4(9): 897-901.

[11] Li Y, Cao H, Wang N, *et al*. A novel antagonist of TLR9 blocking all classes of immunostimulatory CpG-ODNs[J]. Vaccine, 2011, 29(11): 2193-2198.

[12] Li Y, Chen M, Cao H, *et al* Extraordinary GU-rich single-strand RNA identified from SARS coronavirus contributes an excessive innate immune response[J]. Microbes Infect, 2013, 15(2): 88-95.

[13] Jagannathan M, Hasturk H, Liang Y, *et al*. TLR cross-talk specifically regulates cytokine production by B cells from chronic inflammatory disease patients[J]. J Immunol, 2009, 183(11): 7461-7470.

[14] Davidson S, Kaiko G, Loh Z, *et al*. Plasmacytoid dendritic cells promote host defense against acute pneumovirus infection *via* the TLR7-MyD88-dependent signaling pathway[J]. J Immunol, 2011, 186(10): 5938-5948.

[15] Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, *et al*. Small anti-viral compounds activate immune cells *via* the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway[J]. Nat Immunol, 2002, 3(2): 196-200.

[16] Alzabin S, Kong P, Medghalchi M, *et al*. Investigation of the role of endosomal Toll-like receptors in murine collagen-induced arthritis reveals a potential role for TLR7 in disease maintenance[J]. Arthritis Res Ther, 2012, 14(3): R142.

(**收稿**:2012-12-20;**修回**:2013-02-05)

(编辑 吴培红)