DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.09.003

论著

文章编号:1000-5404(2003)09-0750-03

CpG基元在细菌DNA诱导小白鼠THP-1释放细胞因子中的作用

周 红[1],郑 江[2],鲁永玲[1],罗 平[1] (第三军医大学:[1]基础医学部药理学教研室;[2]附属西南医院综合实验研究中心;重庆 400038)

提 要:目的 探讨CpG基元在细菌DNA诱导的细胞因子释放中的作用。方法 实验前1 h经腹腔注射600 mg/kg D-氨基半乳糖(D-Galactoamine, D-GalN)敏化小鼠,采用纯化的大肠杆菌DNA(Escherichia coli DNA, EC DNA)、小牛胸腺DNA(Calf thymus DNA, CT DNA)、含有CpG基元的硫代寡核苷酸(CpG-oligodeoxynucleotides, CpG ODN)和C与G序列颠倒的硫代寡核苷酸(Non-CpG ODN)静脉给予小鼠,DNA的注射剂量为30 mg/kg,ODN的剂量为10 nmol/只,观察EC DNA、DNA、CpG ODN与CT DNA、NON-CpG ODN导致小鼠死亡情况的差异。体外培养THP-1细胞系,在THP-1细胞培养体系中加入上述制剂后,测定细胞因子TNF-α、IL-6、IL-1β的释放情况,观察上述制剂诱导细胞因子释放能力的不同。结果 EC DNA、CpG ODN可诱导小鼠的死亡以及细胞因子的大量释放,而CT DNA、NON-CpG ODN则无此能力。结论 含有CpG基元的寡核苷酸具有诱导巨噬细胞大量释放细胞因子的作用,CpG基元在细菌DNA诱导的细胞因子释放中具有重要的作用,可能是细菌DNA作用的结构基础。

关键词:死亡率;细菌DNA;CpG基元;细胞因子
中图法分类号:R392.12;R394.3 文献标识码:A

Roles of CpG motifs in the release of cytokines induced by bacterial DNA in rats

ZHOU Hong, ZHENG Jiang, LU Yong-ling, LUO Ping (Department of Pharmacology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the roles of CpG motifs in the release of cytokines induced by bacterial DNA. Methods Mice were sensitized with injection of D-GalN (600 mg/kg) into the abdominal cavity 1 h before experiment. Mortality was observed after purified *Escherichia coli* DNA (EC DNA), calf thymus DNA (CT DNA), phosphorothioate backbone CpG-oligodeoxy nucleotides (CpG ODN) and CG sequence inverted oligodeoxy nucleotides (non-CpG ODN) were injected venously into mice. The injection dosage of DNA given was 30 mg/kg but ODN was 10 nmol/mouse. THP-1 cell lines were cultured *in vitro*. After the above reagents were added into the culture, TNF-α, IL-6, IL-1β levels were detected to observe the different abilities of these reagents to induce the release of cytokines. Results EC DNA and CpG ODN could induce the death of mice and the large amount of release of cytokines, but CT DNA and Non-CpG ODN could not. Conclusion CpG ODN has the ability to induce macrophage to release cytokines largely. CpG motifs, which may play an important role in the release of cytokines induced by bacterial DNA, may probably be the structural basis of bacterial DNA.

Key words: mortality; bacterial DNA; CpG motifs; cytokines

近年来临床感染患者因细菌引起的全身性炎症反应综合征(Systemic inflammatory response syndrome, SIRS)以及脓毒血症的病死率呈上升趋势,已成为当前治疗的重点和难点之一。因此多层次、多侧面地研究引起SIRS发生的致病因子和可能的致病机制及其分子机制,对寻找有效的治疗措施、提高病人的生存率具有重要意义。

我们实验室的前期研究显示双链细菌DNA可导致小鼠死亡[1],并引起大鼠血清TNF-α、IL-6的升高[2],提示细菌DNA可能参与细菌所致的炎症反应。由于含有未甲基化CpG基元(CpG motifs)的寡核苷酸片段(CpG-oligodeoxynucleotide, CpG ODN)是细菌DNA的最小作用单位[3],因此本研究采用纯化的大肠杆菌株DNA(*Escherichia coli* DNA, EC DNA)、小牛胸腺DNA(Calf thymus DNA, CT DNA)、含有CpG基元的寡核苷酸

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070299)
作者简介:周 红(1964-),女,江苏省南京市人,博士,副教授,主要从事感染、炎症的发病机制及其拮抗措施方面的研究。电话:(023)68752266
收稿日期:2002-03-07;修回日期:2002-10-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(CpG-oligodeoxy nucleotides, CpG ODN, 5′-TCCATCACGTT CCTGATGCT-3′)和 CG 序列颠倒的寡核苷酸(Non-CpG ODN, 5′-TCCATCAGCTTCCTGATGCT -3′), 比较它们诱导动物死亡以及诱导人单核细胞系 THP-1 释放 TNF-α、IL-6、IL-1 等细胞因子释放能力的差异, 探讨 CpG 基元在细菌 DNA 诱导的细胞因子释放中的作用。

1　材料与方法

1.1　实验材料

THP-1 细胞系购自上海生化细胞所; EC DNA、CT DNA 均为 Sigma 产品; 实验中所用硫代 CpG ODN、硫代 Non-CpG ODN 寡核苷酸片段均由上海生工合成, 经 PAGE 电泳分离纯化; 人 TNF-α、IL-6、IL-1β ELISA 检测试剂盒分别购自法国 Diaclone Research 和美国 Biosource International 公司。试验所用塑料容器均经 ^{60}Co 辐照去热源; 玻璃容器清洁干燥后 250 ℃、1.5 h 处理。

1.2　不同制剂对小鼠的致死作用

清洁级昆明种小白鼠 50 只(本校实验动物中心提供), 体质量(19.45±0.15) g, 雌雄不拘, 随机分为 EC DNA、CT DNA、CpG ODN、Non-CpG ODN 和对照组, 每组 10 只, 实验前 1 h 经腹腔注射 600 mg/kg D-氨基半乳糖(D-Galactoamine, D-GalN)敏化。实验组尾静脉注射 EC DNA、CT DNA、CpG ODN、Non-CpG ODN, 按照文献及我们预实验的结果, DNA 的注射剂量为 30 mg/kg, ODN 的剂量为 10 nmol/只, 空白对照组给予注射用水, 注射体积为 200 μl/20 g, 观察 7 d 内小鼠一般情况。

1.3　不同制剂诱导 THP-1 释放细胞因子

采用 RPMI1640 培养人单核细胞 THP-1, 并调整细胞浓度为 10^6/ml。取灭菌去热原的 48 孔板, 每孔分别加入 0.5 ml 细胞混悬液, 每孔分别加入终浓度为 10 μg/ml EC DNA、10 μg/ml CT DNA、10 mmol/L CpG ODN、10 mmol/L Non-CpG ODN 刺激细胞, 加入体积为 25 μl, 对照组仅加入与实验组相同体积的去热原生理盐水。37 ℃ CO_2 孵箱中培养 20 h 后离心取上清, 采用 ELISA 法检测培养液中 TNF-α、IL-6、IL-1β 的浓度。

1.4　统计学处理

动物死亡率采用 χ^2 检验, 细胞因子浓度采用 t 检验进行均数比较。

2　结果

2.1　不同制剂导致小鼠死亡的情况

小鼠注射 EC DNA、CpG ODN 后, 于 1 h 开始出现死亡, 7~12 h 达高峰, 持续至 24 h, 48 h 后未再发生死亡, 见表 1, CT DNA、Non-CpG ODN 不能导致动物死亡。EC DNA 组、CpG ODN 组与 CT DNA 组、Non-CpG ODN 组、对照组小鼠死亡率相差显著($P<0.01$)。

2.2　不同制剂诱导 THP-1 释放 TNF-α、IL-6、IL-1β 情况

CpG ODN 与 EC DNA 具有诱导 THP-1 大量释放 TNF-α、IL-6、IL-1β 的作用, 而 Non-CpG ODN、CT DNA 则无此能力。EC DNA 组细胞因子水平与 CT DNA 组、对照组具有明显差别($P<0.01$), CpG ODN 组与 Non-CpG ODN、对照组具有明显差别($P<0.01$), 表明有无 CpG 基元对诱导 TNF-α 等细胞因子释放具有重要作用, 见表 2。

表 1　小鼠死亡的时间分布

Tab 1　The death numbers of mice at different time after given different agents

Group	Time(h)				
	1~6	7~12	13~18	19~24	Total
EC DNA	3	5	1	1	10☆★
CT DNA	0	0	0	0	0
CpG ODN	2	5	1	2	10※★
Non-CpG ODN	0	0	0	0	0
Control	0	0	0	0	0

☆: $P<0.01$ *vs* CT DNA group; ★: $P<0.01$ *vs* control group; ※: $P<0.01$ *vs* non-CpG ODN group

表 2　不同制剂诱导细胞因子释放能力的测定($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Determination of the release levels of cytokines induced by different reagents($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Cytokines (pg/ml)		
	TNF-α	IL-6	IL-1β
EC DNA	1352.3±92.6☆★	565.0±32.5☆★	344.3±40.4☆★
CT DNA	15.7±2.1	5.7±3.5	12.7±6.0
CpG ODN	1509.3±74.4※★	415.3±23.1※★	304.0±19.3※★
Non-CpG ODN	27.3±8.1	81.7±10.4	12.0±6.1
Control	10.0±2.6	20.0±5.6	10.0±3.0

☆: $P<0.01$ *vs* CT DNA group; ★: $P<0.01$ *vs* control group; ※: $P<0.01$ *vs* non-CpG ODN group

3　讨论

SIRS 是一系列由感染或非感染因素引起的炎症介质(包括 TNF-α、IL-1、IL-6 等)诱发的全身性炎症反应综合征。目前已知介导 SIRS 的主要物质为革兰阴性杆菌外膜上的内毒素(Lipopolysacchride, LPS)、革兰阳性细菌细胞壁上的肽多糖、磷壁酸及外毒素、原核细菌的基因组 DNA, 其中存在于革兰阴性杆菌和革兰阳性球菌的基因组 DNA 在 SIRS 中的作用越来越受到大家的重视, 其在 SIRS 中可单独或与其它介质协同发挥诱导 SIRS 的发生[4]。

本研究的前期工作提示双链大肠杆菌 DNA 静脉注射正常小鼠可致小鼠死亡, 且具有明显的量效关系; CT DNA 并不能导致小鼠死亡, 说明 EC DNA 与 CT DNA 在生物学活性上具有很大的差异[1]。提示细菌 DNA 是导致炎症反应的重要因素, 但细菌 DNA 引起 SIRS 的作用及其结构基础是什么尚不清楚。

为进一步探索细菌 DNA 诱导细胞因子释放的结构基础, 本研究采用含有未甲基化的 CpG 基元的寡核苷酸, 比较含有未甲基化的 CpG 基元的寡核苷酸和 CG 序列颠倒的寡核苷酸导致小鼠死亡发生情况以及诱导细胞因子释放能力的差异, 阐明 CpG 基元在细菌 DNA 引起的细胞因子释放中的重要性。为提高小鼠对影响因素的敏感性, 本实验中采用腹腔注射 D-氨基半乳糖破坏小鼠的肝细胞, 降低小鼠肝组织的解毒功能, 从而使小剂量的细菌 DNA 更易引起小鼠的死亡[11]。

有文献[5]报道哺乳动物巨噬细胞可通过模式识别受体 TLR9 (Toll-like receptor 9)识别细菌 DNA, TLR9 识别细菌 DNA 的结构基础则是未甲基化 CpG 基元。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

由于细菌等原核细胞的 DNA 中含有大量的未甲基化 CpG 基元，而在真核细胞的 CpG 基元出现频度很低而且80%为甲基化状态，因此哺乳动物巨噬细胞可通过识别 CpG 基元来判断是否有细菌入侵[6,7]。

本研究中使用的 CpG ODN 序列在许多微生物的基因组中都存在，而且出现频率较高，是多数学者用来研究 CpG 基元作用的序列[8]。我们的研究结果显示 CpG ODN 与 EC DNA 一样可以导致动物的死亡，而 CpG 序列颠倒的寡核苷酸和 CT DNA 却不能导致动物的死亡。CpG ODN 和 CpG 序列颠倒的 Non-CpG ODN 尽管只是 C 与 G 序列的颠倒，但是其作用却完全不同，说明有无 CpG 基元对细菌诱导 TNF-α 等细胞因子释放具有重要作用，这与文献[9,10]报道的一致。

为进一步说明 CpG ODN 诱导 SIRS 发生的作用机制，我们观察了与 SIRS 发生密切相关的细胞因子变化情况，其中 TNF-α、IL-6 水平的升高常被作为 SIRS 发生中细胞因子级联反应的启动及其严重程度的标志[11]。结果发现细菌 EC DNA、CpG ODN 可诱导 TNF-α、IL-6、IL-1 的升高，但 CT DNA、CpG 序列颠倒的寡核苷酸则无此作用，进一步说明 CpG 序列在细菌 DNA 引起的细胞因子释放中具有重要作用，是引起动物死亡和细胞因子大量释放的物质基础。

LPS 是引起 SIRS 发生的重要物质，在自然界中无处不在，为排除 LPS 在实验中的干扰，本研究中所用物品均经去热原处理，细胞培养用血清为 Hyclone 公司的去热原小牛血清，细胞培养上清经鲎试剂检测，内毒素含量均小于 50 pg/ml，有效保证了实验结果的可靠性。

参考文献：

[1] 潘文东，周 红，郑 江，等. 大肠杆菌 DNA 对小鼠致死作用的初步研究[J]. 第三军医大学学报，2001，23(4)：395－397.

[2] Pan W D，Zhou H，Zheng J，*et al*. Role of *E. coli* DNA in systemic inflammatory response syndrome[J]. J Med Coll PLA，2002，17(3)：210－213.

[3] Neujahr D C，Reich C F，Pisetsky D S. Immunostimulatory properties of genomic DNA from different bacterial species[J]. Immunobiology，1999，200(1)：106－119.

[4] Sparawasser T，Miethke T，Lipford G B，*et al*. Bacterial DNA causes septic shock[J]. Nature，1997，386(6623)：336－337.

[5] Hiroaki H，Osamu Takeuchi，Taro Kawai，*et al*. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA[J]. Nature，2000，408(6813)：740－745.

[6] Sparawasser T，Miethke T，Lipford G B，*et al*. Macrophage sense pathogens *via* DNA motifs：induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock[J]. Eur J Immunol，1997，27(7)：1671－1679.

[7] Bauer M，Heeg K，Wagner H，*et al*. DNA activates human immune cells through a CpG sequence-dependent manner[J]. Immunology，1999，97(4)：699－705.

[8] Lipford G B，Sparwasser T，Bauer M，*et al*. Immunostimulatory DNA：sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines[J]. Eur J Immunol，1997，27(12)：3420－3426.

[9] Schwartz D A，Quinn T J，Thorne P S. CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory track[J]. J Clin Invest，1997，100(1)：68－73.

[10] Elkins K L，Rhinehart Jones T R，Stibitz S，*et al*. Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria[J]. J Immunol，1999，162(4)：2291－2298.

[11] 陈基岱，景炳文，李 萍，等. 多系统器官衰竭及败血症患者肿瘤坏死因子和白介素6的水平和意义[J]. 中国危重病急救医学，1993，5(6)：325－327.

（编辑 薛国文）

（上接749页）

讨论

癌肉瘤是一种非常少见的肿瘤[1]。Wargotz 等[2]认为癌肉瘤为化生性癌的一种亚型，但有人主张癌肉瘤这一名称应仅限于用来指癌与肉瘤成分分别起源于上皮与间叶的乳腺肿瘤，也有人认为该肿瘤是叶状囊肉瘤中的癌[3]。它好发于中年以上妇女，表现为乳腺内肿块，大小不等，质地硬，边界清楚，多数可活动，少数肿块与皮肤粘连，腋窝淋巴结常不肿大，发病时间自几周至数十年不等。组织学上，癌的成分常为浸润性导管癌，肉瘤成分常是纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、多形性肉瘤、脂肪肉瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、两种或两种以上的肉瘤成分混合[4]。

癌肉瘤需与肉瘤化癌、叶状囊肉瘤、产生基质的癌相鉴别。癌肉瘤的癌与肉瘤的成分分别来自上皮与间叶组织，它的肉瘤样区 Cytokeratin 表达阴性，Vinmentin 表达阳性，S-100 表达阳性，网状纤维染色肉瘤细胞见大量网状纤维，癌的成分也很明显，癌与肉瘤的成分无明显移行；肉瘤化癌的肉瘤样区 Cytokeratin 表达阳性，网状纤维染色癌细胞间无网状纤维，癌细胞巢周围有网状纤维包绕，癌与肉瘤样区之间有移行；叶状囊肉瘤是由良性上皮成分和异型间叶成分构成，当其上皮成分发生恶变时，可诊断为癌肉瘤；如果肿瘤从癌的成分直接移行为软骨和(或)骨基质而没有梭形细胞介于中间，应诊断为产生基质的癌[2]。

本例癌的成分为明确的浸润性导管癌，肉瘤成分为骨肉瘤，两者之间无明显移行，癌肉瘤的诊断是明确的。在乳腺癌肉瘤中，肉瘤成分是骨肉瘤的尚少见，而不同的肉瘤成分与预后的关系目前尚无定论。此病一经确诊，应立即手术，手术以乳腺癌改良根治术为主要手术方式，同时应辅助放疗、化疗等综合治疗方法。本病预后较化生性癌的其他亚型稍差，5年生存率为49%，临床病期和初次切除时肿瘤的大小是影响预后的关键。研究表明：当肿块的大小为4 cm 时，复发率显著增高；TNM 分期Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期5年生存率分别为100%、63%、35%[2]。

关键词：乳腺；癌肉瘤
中图法分类号：R737.9 文献标识码：B

参考文献：

[1] Tsekeris P，Dimou S. Endometrial carcinosarcoma and breast carcinoma：a case report[J]. Eur J Gynaecol，2000，21(3)：309－310.

[2] Wargotz E S，Norri H J. Metaplasic carcinomas of the breast Ⅲ：cacinosarcoma[J]. Cancer，1989，64(7)：1490－1499.

[3] 许中良. 乳腺病理学[M]. 上海：上海医科大学出版社，1999. 177－178.

[4] 刘复生. 中国肿瘤病理学分类[M]. 北京：科学技术文献出版社，2001. 407－408.

（编辑 王 红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net