

# 细菌 DNA 拮抗措施研究进展

王良喜 周红

细菌 DNA 能够激活哺乳动物巨噬细胞、树突状细胞、B 细胞以及自然杀伤细胞 (NK) 等多种免疫细胞,诱导肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 (IL) 1、IL-12、 $\gamma$  型干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 等炎症介质释放<sup>[1]</sup>,引起急性炎症反应,甚至发展为全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) 并导致死亡<sup>[2,3]</sup>。细菌 DNA 免疫刺激效应的结构基础是 CpG 基元 (CpG motif),即以未甲基化的 CpG 二核苷酸为核心的特定短核苷酸序列,所以细菌 DNA 也被称为 CpG DNA。人工合成的含有 CpG 基元的寡核苷酸 (oligonucleotide, ODN) 能够模拟细菌 DNA 的免疫刺激活性<sup>[4]</sup>,故称之为 CpG-S ODN (stimulatory CpG oligonucleotide)。

脓毒症 (sepsis) 是由感染引起的 SIRS,为严重创伤患者的常见并发症及主要死亡原因之一。由于细菌 DNA 是 SIRS 的重要启动因素之一,因此,拮抗细菌 DNA 理论上可以防治脓毒症、降低严重创伤患者的病死率。关于细菌 DNA 或 CpG-S ODN 拮抗措施的研究国外尚处于起步阶段,国内鲜见相关报道。

## 一、氯喹等内体酸化抑制剂

氯喹等药物抑制 CpG DNA 的机制与细菌 DNA 诱发炎症反应的分子机制有关。细菌 DNA 与细胞膜结合并被细胞摄入内体中;接着内体酸化成熟,导致细菌 DNA 能够与其模式识别受体即 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 9 相结合,从而启动两条信号转导途径,即核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 途径和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogenactivated protein kinases, MAPK) 途径,导致 NF- $\kappa$ B 及激活蛋白 1 (activator protein 1, AP-1) 等转录因子活化,进而诱导细胞合成、释放大量的炎症介质<sup>[5]</sup>。

内体酸化是细菌 DNA 诱导的胞内信号转导途径的初始环节,是细菌 DNA 激活细胞必不可少的环节。氯喹等碱性药物及 bafilomycin A 等内体 H<sup>+</sup> 泵抑制剂能改变内体中的 pH 值,从而抑制内体酸化,因而能够有效地阻断细菌 DNA 的免疫刺激效

应<sup>[5,6]</sup>。当然,这并非氯喹及其结构类似物拮抗 CpG DNA 的惟一机制,因为即使给予低浓度的上述药物,虽不足以改变内体中的 pH 值,也能明显抑制 CpG DNA 的生物活性,其确切机制尚不清楚<sup>[6]</sup>。

## 二、抑制性 ODN/DNA

抑制性 ODN/DNA 是细菌 DNA (或 CpG-S ODN) 的拮抗剂,主要包括 CpG-N ODN (neutralizing CpG oligonucleotide)<sup>[7,8]</sup>、含有 C (或 A) GGGN (N 代表任一碱基) 结构的 ODN<sup>[9,10]</sup>、由 30 个单一碱基组成的 ODN<sup>[11]</sup> 以及含甲基化 CpG 的 DNA<sup>[12]</sup>。

1. CpG-N ODN: 1998 年 Krieg<sup>[7]</sup> 在研究腺病毒基因组 DNA 的免疫刺激效应时,发现了 CpG-N ODN。与大肠杆菌基因组 DNA 相比,腺病毒基因组 DNA 中具有相似出现频率的 CpG 二核苷酸,但不同血清型的腺病毒却表现出截然不同的免疫效应,其中 12 型腺病毒的 DNA 具有与大肠杆菌 DNA 相似的免疫刺激效应,而 2 型、5 型腺病毒的 DNA 不仅不能激活哺乳动物的免疫细胞,反而能有效地抑制大肠杆菌 DNA 诱导的细胞因子释放。他们对 DNA 中含有 CpG 的 6 碱基短核苷酸序列 (hexamers) 进行对比研究,结果显示 2 型、5 型腺病毒 DNA 中的 CpG-S 基元仅为 12 型腺病毒 DNA 和大肠杆菌 DNA 的 1/3 ~ 1/6,且远低于理论推算频率;GCCGCG 等 6 种序列尽管在 2、5、12 型腺病毒 DNA 中出现频率均最高,但其在 2、5 型中出现频率却是 12 型的 3 ~ 6 倍,且远远高于理论推算值。因此,他们认为这 6 种序列是 2、5 型腺病毒 DNA 中的 CpG-N 基元,同时根据这 6 种序列的结构特点,推测 CpG-N 基元可能具有 3 种共同特征,即 CpG 重复序列、CCG 序列以及 CGG 序列。Krieg 等<sup>[7]</sup> 的体外、体内实验已证实:当人工合成的 GCCGCG 序列的 CpG-N ODN 与 CpG-S ODN 浓度比为 1:1 时,前者可显著抑制后者的免疫刺激效应。但是 Zhao 等<sup>[8]</sup> 却未能重复出以上实验结果。他们在实验中即使给予 10 倍浓度的 CpG-N ODN,也只能部分抑制 CpG-S ODN 的免疫刺激效应,而且不含 CpG 的 ODN 也能相似地抑制 CpG-S ODN 的生物活性,因此推测 ODN 抑制 CpG-S ODN 是非 CpG 特异性的。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目 (G1999054203);  
国家自然科学基金资助项目 (30271512)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学基础部药理学教研室

两个相似的实验得到的结果却存在较大差异,原因可能在于:Krieg 等<sup>[7]</sup>未以不含 CpG 的 ODN 作为对照,其所使用的硫代修饰 ODN (phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotides, PS-ODN) 的浓度远远高于 Zhao 等<sup>[8]</sup>使用的 PS-ODN 浓度,并且超过了 1  $\mu\text{mol/L}$ 。研究表明,在高浓度时 ( $\geq 1 \mu\text{mol/L}$ ), PS-ODN 能够表现出 CpG 非依赖性的抑制效应<sup>[13]</sup>。因此 2、5 型腺病毒 DNA 中的特征性 CpG-N 基元及其可能的共同特征尚有待进一步探索。

2. 含有 C/AGGGN 结构的抑制性 ODN: Krieg 等<sup>[7]</sup>对抑制性 ODN 作了进一步的研究。他们认为,当把 CpG-S ODN 中的 CpG-S 基元 GCGTT 或 ACGTT 替换为 GCGGG 或 ACGGG 时, CpG-S ODN 也就转换成了抑制性 ODN。这类抑制性 ODN 的共同特征是具有 3 个连续的鸟嘌呤。如果在其后再加一个鸟嘌呤,则抑制作用更强<sup>[9]</sup>。该类抑制性 ODN 能够有效地抑制由 CpG-S ODN 诱导的 B 细胞释放 IL-6 等效应,其可能的作用机制为抑制 NF- $\kappa$ B 的活化及核移位,具体包括:抑制核抑制因子  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) 降解;抑制 NF- $\kappa$ B p50 的前体分子 p105 降解;抑制 NF- $\kappa$ B 向核内转移<sup>[10]</sup>。

3. 由 30 个单一碱基组成的抑制性 ODN: 由 30 个单一碱基组成的 PS-ODN (SdA30、SdC30、SdG30、SdT30) 以及由 30 个单一鸟嘌呤组成的磷酸二酯 ODN (dG30) 能够有效抑制大肠杆菌 DNA 诱导的巨噬细胞炎症介质释放,该抑制作用具有时间、剂量依赖性,且即使在大肠杆菌 DNA 刺激后 12 h 才加入 ODN,也能够表现出抑制效应。其可能的作用机制包括:抑制细胞摄取大肠杆菌 DNA;阻断信号转导途径,例如抑制 MAPK 活化;多个连续的 dG 形成更高级的、稳定的空间构象<sup>[11]</sup>。

4. 含甲基化 CpG 的 DNA: 小牛胸腺 DNA (calf thymus DNA, CT DNA) 等哺乳动物 DNA 不具有免疫刺激活性,近来研究显示这些 DNA 可有效抑制大肠杆菌 DNA 的免疫活性。该效应可能与抑制细胞摄取大肠杆菌 DNA 无关,而甲基化的 CpG 则在其中起着主要的作用。它们能够阻断大肠杆菌 DNA 诱导的信号转导途径,从而抑制 NF- $\kappa$ B 及 AP-1 等转录因子的核移位<sup>[12]</sup>。

### 三、乳铁蛋白

乳铁蛋白是机体非特异性防御系统中的一种重要糖蛋白,是中性粒细胞特异性颗粒中的一种主要成分,存在于黏膜表面和感染部位,在黏膜表面及乳汁中浓度较高。乳铁蛋白的氨基端富含精氨酸而

带正电荷,因而能迅速地与带负电荷的细菌 DNA 相结合,该过程是通过电荷之间的相互作用而实现,是 CpG 基元非依赖性的。细菌 DNA 与乳铁蛋白结合后, DNA 的细胞摄取及内化过程明显受抑<sup>[2]</sup>。

### 四、其他措施

去除 CpG-S ODN 中的 CpG-S 基元或将其替换为 CpG-N 基元,能够明显削弱 CpG-S ODN 的免疫刺激活性<sup>[7]</sup>;在 CpG-S ODN 序列的适当位置添加 1 个或多个 polyG 序列,也能够明显减少 CpG-S ODN 诱导的炎症介质释放<sup>[14]</sup>。但是,以上措施均要求预先改变 CpG-S ODN 序列基因,因此只适用于在进行基因治疗时减轻载体的免疫刺激作用,而不宜用以防治细菌感染时细菌 DNA 诱发的炎症反应。

此外,有研究显示细菌 DNA 可直接激活 DNA 依赖性蛋白激酶的催化亚单位 (catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase, DNA-PKcs), 从而诱导 NF- $\kappa$ B 活化; DNA-PKcs 抑制剂 Ly294002 能够抑制细菌 DNA 诱导的细胞因子释放<sup>[15]</sup>。敲除 tlr9 基因也能够导致细菌 DNA 的免疫活性消失<sup>[16]</sup>。但是,以上措施仅在研究细菌 DNA 激活免疫细胞的分子机制时被应用,而用于拮抗细菌 DNA 免疫刺激效应的研究鲜见报道。

### 五、小结

上述细菌 DNA 拮抗措施中,有的仅对某一类细胞有效,有的则缺乏特异性和高效性,且绝大部分措施还仅限于体外实验研究阶段,对其作用机制尚缺乏深刻认识。因此,要找到特异、高效的细菌 DNA 拮抗措施并应用于临床,可谓任重而道远。

尽管如此,目前的研究结果却能给出一个有益的启示,即拮抗细菌 DNA 的炎症刺激效应是完全有可能的。可以预见,拮抗细菌 DNA 的重要性将被逐渐认识,而且终将能够找到有效的拮抗措施。

### 参 考 文 献

- 1 Weighardt H, Feterowski C, Veit M, et al. Increased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides is related to an enhanced innate effector cell response. *J Immunol*, 2000, 165: 4537-4543.
- 2 Britigan BE, Lewis TS, Waldschmidt M, et al. Lactoferrin binds CpG-containing oligonucleotides and inhibits their immunostimulatory effects on human B cells. *J Immunol*, 2001, 167: 2921-2928.
- 3 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. *第三军医大学学报*, 2001, 23: 395-397.
- 4 Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 9237-9242.
- 5 Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20: 709-760.

- 6 Macfarlane DE, Manzel L. Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J Immunol*, 1998, 160: 1122 - 1131.
- 7 Krieg AM, Wu T, Weeratna R, et al. Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 12631 - 12636.
- 8 Zhao HM, Cheng SH, Yew NS. Requirements for effective inhibition of immunostimulatory CpG motifs by neutralizing motifs. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2000, 10: 381 - 389.
- 9 Stunz LL, Lenert P, Peckham D, et al. Inhibitory oligonucleotides specifically block effects of stimulatory CpG oligonucleotides in B cells. *Eur J Immunol*, 2002, 32: 1212 - 1222.
- 10 Lenert P, Stunz L, Yi AK, et al. CpG stimulation of primary mouse B cells is blocked by inhibitory oligodeoxyribonucleotides at a site proximal to NF-kappaB activation. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2001, 11: 247 - 256.
- 11 Zhu FG, Reich CF, Pisetsky DS. Inhibition of murine macrophage nitric oxide production by synthetic oligonucleotides. *J Leukoc Biol*, 2002, 71: 686 - 694.
- 12 Chen Y, Lenert P, Weeratna R, et al. Identification of methylated CpG motifs as inhibitors of the immune stimulatory CpG motifs. *Gene Ther*, 2001, 8: 1024 - 1032.
- 13 Sester DP, Naik S, Beasley SJ, et al. Phosphorothioate backbone modification modulates macrophage activation by CpG DNA. *J Immunol*, 2000, 165: 4165 - 4173.
- 14 Lee SW, Song MK, Baek KH, et al. Effects of a hexameric deoxyribo-guanosine run conjugation into CpG oligodeoxynucleotides on their immunostimulatory potentials. *J Immunol*, 2000, 165: 3631 - 3639.
- 15 Chu WM, Gong X, Li ZW, et al. DNA-PKcs is required for activation innate immunity by immunostimulatory DNA. *Cell*, 2000, 103: 909 - 918.
- 16 Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 2000, 408: 740 - 745.

(收稿日期: 2003-05-16)

(本文编辑: 莫 愚 罗 勤)

## · 经验交流 ·

## 治疗黄磷烧伤 60 例

葛茂星 梁明 陈宗华 李建伟 张嘉

临床资料: 1994 年 1 月 ~ 2001 年 12 月笔者单位共收治黄磷烧伤患者 60 例, 其中男 59 例、女 1 例, 年龄 17 ~ 45 岁。伤后入院时间 2 ~ 96 h。烧伤总面积 1% ~ 97% [(18.86 ± 21.45)%] TBSA, II ~ III 度; 其中烧伤面积 ≥ 10% TBSA 者 31 例、≤ 9% TBSA 者 29 例。伤后立即用大量清水冲洗者 57 例, 冲洗时间 10 ~ 60 min; 未冲洗者 3 例。用 0.2% ~ 2.0% 硫酸铜溶液冲洗或湿敷创面 6 例, 其中 1 例烧伤总面积 42%、III 度 4% TBSA 的患者创面用 1% 硫酸铜后发生急性溶血反应。合并休克 6 例, 恶心、呕吐 18 例, 支气管痉挛 1 例, 10 例患者出现不同程度的呼吸困难。肝功能异常 27 例, 肾功能异常 22 例, 心肌损伤 9 例。

治疗: 入院后烧伤总面积 ≥ 15% TBSA 的患者按公式<sup>[1]</sup>补液抗休克, 静脉滴注 10% 葡萄糖酸钙 20 ~ 40 ml/d。用大量清水冲洗创面, 对深 II 度以上的创面尽早行切削痂术; 切痂面积 > 40% TBSA 的患者术后用异体(种)皮覆盖创面, 3 ~ 5 d 后再次行自体皮移植术。非手术治疗患者 26 例, 创面用 5% 碳酸氢钠溶液湿敷 24 ~ 48 h 后改涂磺胺嘧啶银霜 + 表皮生长因子(金因肽, 深圳华生元基因工程发展有限公司), 包扎或暴露疗法至创面愈合。对烧伤面积 ≥ 10%、深 II 度面积 ≥ 3% TBSA 的患者, 入院后常规保肝治疗, 给予心肌营养药,

定期复查肝、肾功能、心肌酶谱和心电图。其余患者予常规抗感染、对症和营养支持治疗。

结果: 本组患者治愈 59 例, 其中最大烧伤面积 71%、III 度 65% TBSA。死亡 1 例, 其烧伤总面积为 97%, III 度 75% TBSA, 伤后 7 d 因急性肾功能不全并发多器官功能障碍综合征死亡。

讨论 黄磷烧伤后现场急救时并不能完全去除创面上的磷颗粒, 入院后需再次大量冲洗。本组 1 例患者伤后在外院用 1% 硫酸铜淋洗创面后发生急性溶血反应, 系硫酸铜过量中毒, 应引以为戒<sup>[2]</sup>。对有休克症状及呼吸困难者, 应在入院后 3 h 内快速补入第 1 个 24 h 输液量的 45% ~ 50%, 高流量吸氧。黄磷烧伤后磷迅速吸收, 伤后数小时内即有肝、肾、心等重要脏器损伤的表现<sup>[1]</sup>, 不能因烧伤面积小而忽视对脏器损害的防治。本组除 1 例患者死亡外, 其余伤后肝、肾、心肌功能受损的患者预后良好。

## 参 考 文 献

- 1 黎鳌, 主编. 黎鳌烧伤学. 上海: 上海科学技术出版社, 2001. 225 - 228.
- 2 盛志勇, 郭振荣, 主编. 危重烧伤治疗与康复学. 北京: 北京科学出版社, 2000. 78 - 94.

(收稿日期: 2003-11-26)

(本文编辑: 苟学萍)

作者单位: 650101 昆明医学院附属第二医院烧伤科