

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00372

CpG-ODN 对小鼠骨髓造血系统辐射损伤的保护作用

张超,高福,崔建国,程赢,孙顶,周传丰,刘聪,李百龙,蔡建明*

第二军医大学海军医学系放射医学教研室,上海 200433

[摘要] **目的** 探讨 Toll 样受体 9(Toll-like receptor 9, TLR9)激动剂——含 CpG 基序的寡核苷酸(CpG-ODN)对小鼠骨髓造血系统辐射损伤的治疗作用。**方法** 小鼠在照射后 30 min、24 h、48 h 连续腹腔注射 CpG-ODN(50 μ g/只),观察小鼠不同剂量照射后存活率的变化,检测特定时间内血液中白细胞和骨髓中有核细胞的含量及其骨髓病理切片,外源性脾结节集落形成数。**结果** CpG-ODN 能提高照射后小鼠的存活率,提高小鼠外周血白细胞和骨髓有核细胞数($P < 0.01$),缓解骨髓病理学的损伤,减少骨髓干细胞的死亡。**结论** CpG-ODN 能减轻小鼠骨髓造血系统辐射损伤。

[关键词] CpG-ODN; Toll 样受体 9; 辐射损伤; 骨髓; 造血系统**[中图分类号]** R 818.83 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)04-0372-05

Protective effect of CpG-ODN against irradiation injury of bone marrow hematopoietic system in mice

ZHANG Chao, GAO Fu, CUI Jian-guo, CHENG Ying, SUN Ding, ZHOU Chuan-feng, LIU Cong, LI Bai-long, CAI Jian-ming*

Department of Radiation Medicine, Faculty of Navy Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To study the therapeutic effect of CpG-ODN, an agonist of Toll-like receptor 9 (TLR9), on irradiation injury of bone marrow hematopoietic system in mice. **Methods** Mice were treated with intraperitoneal injection of CpG-ODN (50 μ g each) at 30 min, 24 h and 48 h after irradiation. The survival rates of animals were observed after irradiation with different doses, the numbers of white blood cell (WBC) and bone marrow nucleated cells within a certain period of time were observed, the bone marrow was pathologically studied, and the number of endogenous colony forming unit-spleen (endoCFU-S) was counted. **Results** Our results showed that intraperitoneal injection of CpG-ODN significantly improved the survival rate of mice and increased the numbers of peripheral WBC and bone marrow nucleated cells ($P < 0.01$); moreover, it also ameliorated the pathological injury of the bone marrow and reduced the death of bone marrow stem cells. **Conclusion** Intraperitoneal CpG-ODN injection can ameliorate the irradiation injury of bone marrow hematopoietic system in mice.

[Key words] CpG-ODN; Toll-like receptor 9; radiation injuries; bone marrow; hematopoietic system

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(4): 372-376]

Toll 样受体(TLR)蛋白具有介导免疫的作用,于 1988 年首先在果蝇体内被发现^[1],1997 年在人体内发现其同系物,称为人类 Toll 蛋白^[2]。其家族成员属于进化比较保守的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR),能够识别病原微生物的相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs)。哺乳动物中已发现了 11 种 TLR (TLR 1~11)^[3],均为 I 型跨膜蛋白,其共同结构特点是膜外具有富亮氨酸重复序列,膜内是一段结构保守的区域,为细胞内信号转导的起始部位。TLRs 识别的 PAMPs 是一类高度保守的分子结构,这些

PAMPs 分子结构存在于病原体内。TLRs 与 PAMPs 相互作用启动免疫反应,激活机体的天然免疫系统。不同 TLRs 识别的 PAMPs 也有差异,如:TLR 1、2、4、6 识别病原体的脂类部分;TLR5 识别病原体的蛋白质分子;TLR 3、7、8、9 识别病原体的核酸分子^[4]。

Burdelya 等^[5]应用改良型 TLR5 激动剂(一种沙门菌鞭毛蛋白)激活 TLR5 信号分子,可明显减轻辐射损伤,即使在照射后 2 h 给药,仍然有较好的效果,其作用机制可能与活化 NF- κ B(nuclear factor kappa B)信号途径有关。因此,TLRs 及其激动剂可

[收稿日期] 2011-04-06 **[接受日期]** 2011-04-11**[基金项目]** 国家自然科学基金(31070762),上海市自然科学基金(10ZR1437500). Supported by National Natural Science Foundation of China(31070762) and Natural Science Foundation of Shanghai(10ZR1437500).**[作者简介]** 张超,硕士生. E-mail: river198410@yahoo.com.cn

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871148, E-mail: cjm882003@yahoo.com.cn

能在辐射损伤治疗方面有着广泛的应用前景。TLR9 是 TLRs 家族的重要成员之一,其配体激动剂为含 CpG 基序的寡核苷酸(CpG-ODN)。人工合成的 CpG-ODN 能够模拟细菌中非甲基化 CpG 序列^[6],诱导哺乳动物产生免疫反应,在预防和治疗肿瘤、变应性疾病、感染性疾病等方面发挥重要作用。但目前缺乏其对辐射损伤治疗作用的相关研究。因此,本研究采用 CpG-ODN 腹腔注射治疗辐射损伤后的小鼠,观察小鼠血液系统的变化,探讨 CpG-ODN 可能的辐射损伤治疗效果。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 CpG-ODN 的制备合成委托上海生工生物工程技术有限公司合成,具体基序为:5'-TCG TCG TTT TCG GCG CGC GCC G-3',共由 22 个核苷酸组成,并且对部分碱基进行了硫代修饰或磷酸化修饰(加下划线的碱基为硫代修饰,其他碱基为磷酸化修饰),将合成的 CpG-ODN 粉末用去离子水配制成浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的储备液,使用时用 PBS 稀释到所需浓度。红细胞裂解液:由 3 ml 冰醋酸加 97 ml 生理盐水配制;CASY 细胞计数液:由 CASY-Technology 公司提供;Bouin 固定液:由饱和苦味酸 75 ml,40% 甲醛 25 ml,冰醋酸 5 ml 配制而成;脱钙液:由盐酸 70 ml,甲酸 200 ml,冰醋酸 30 ml,甲醛 100 ml,氯化钠 9 g,无水乙醇 600 ml 配制而成。

1.2 动物分组及处理 BALB/c 小鼠,SPF 级,雄性,20~22 g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司上海实验动物资源中心提供,上海市实验动物质量监督检验站检验合格。每笼内饲养 5~6 只小鼠,小鼠自由进食和进水,食物通过辐照灭菌,水通过高压高温灭菌;动物房内温度和湿度保持恒定。小鼠被随机分为正常组、单纯给药组、单纯照射组、照射给药组。将受照小鼠固定放置于透明塑料盒内,接受不同剂量⁶⁰Co γ 射线全身照射。照射后 30 min、24 h、48 h 通过腹腔注射连续给予单纯给药组和照射给药组小鼠 CpG-ODN(50 $\mu\text{g}/\text{只}$)。

1.3 一般指标

1.3.1 小鼠存活率、LD_{50/30} 及 DRF 值 小鼠(16~20 只/组)分别接受 6.0、6.5、8.0、10.0 Gy γ 射线照射,观察各组小鼠存活时间,并以百分比形式表示;通过 Excel 对照射剂量和小鼠存活率进行线性拟合,计算出各组的 LD_{50/30} 和 DRF(照射给药组 LD_{50/30} 与单纯照射组 LD_{50/30} 的比值)。

1.3.2 外周血白细胞计数 小鼠(6 只/组)受到 6.0 Gy 照射,各组给予对应处理。在照射后 1、9、28 d,尾静脉取血进行白细胞计数。具体操作如下:将小鼠固定并充分暴露其尾部,用乙醇棉擦拭消毒,用 4 号针头扎入其尾静脉中,取流出的血液 5 μl ,放入 495 μl 3% 的红细胞裂解液中破红,再从中取 10 μl 放入 5 990 μl CASY 液中,通过细胞计数及分析系统对白细胞计数。

1.3.3 骨髓有核细胞计数 小鼠(6 只/组)受到 6.0 Gy 照射后,各组给予对应处理,在照射后 1、9、28 d,取股骨,用带有 6 号针头的 1 ml 注射器吸取 1 ml CASY 液,扎入股骨腔内,反复冲洗股骨使其内的骨髓细胞完全形成骨髓单细胞悬液,取 10 μl 加入 5 990 μl CASY 液中,通过细胞计数及分析系统进行骨髓有核细胞计数。

1.4 骨髓组织 H-E 染色 小鼠受到 6.0 Gy 照射,各组给予对应处理,在照射后 1、9、28 d 取股骨,首先放入 10% 甲醛固定 24 h,然后放入脱钙液中脱钙 24 h,最后委托第二军医大学基础部解剖与组胚学教研室将样本制成 H-E 染色切片,光镜下观察并拍照。

1.5 外源性脾集落形成单位(CFU-S)测定 取各组给予对应处理的小鼠各 4 只,脱臼处死,放入装有 75% 乙醇的瓶中,浸泡 3~5 min;在无菌条件下,每只小鼠取一侧股骨,以无菌纱布除掉附着的肌肉;修净股骨并剪去两端,用装有 6 号针头的 1 ml 注射器将骨髓腔中的骨髓细胞全部冲入盛有 100 ml RPMI 1640 培养液的广口瓶中,然后用装有 4 号针头的 1.0 ml 注射器吹成单细胞悬液;取细胞悬液 0.1 ml 加入 0.9 ml RPMI 1640 培养液中,混匀后作用片刻时间,取出一定量滴于细胞计数板的计数池内,在显微镜下计数 4 个大格细胞数(N),依下式计算每毫升有核细胞数(C): $C = N \times 2.5 \times 10^5 / \text{ml}$,配成密度为 $5 \times 10^5 / \text{ml}$;取受体小鼠,进行⁶⁰Co γ 线照射,剂量为 7.0 Gy,照射后 2~4 h 内将准备好的 $5 \times 10^5 / \text{ml}$ 密度的骨髓细胞悬液充分混匀后,用 4 号针头通过尾静脉注射入受体小鼠体内,每只鼠注入 0.2 ml,内含骨髓细胞 10^5 个;输注骨髓细胞 9 d,杀死受体小鼠取其脾脏,放入 Bouin 固定液内固定 12 h。用放大镜检查脾脏表面形成的灰黄色结节数。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计分析软件,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。照射给药组与单纯照射组间比较采用两组独立样本 *t* 检验,两组存活率间统计分析采用 Kaplan-Meier 法。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 各组小鼠存活情况的对比分析 给予6.0、6.5、8.0、10.0 Gy照射后,单纯照射组30 d存活率分别为95%、58%、36%、0;照射给药组分别为100%、89%、81%、25%(图1A)。Kaplan-Meier生存分析统计生存率差异,结果(图1B)显示:8.0、10.0 Gy照射后给药组存活率高于各自单纯照射组($P < 0.01$)。对不同剂量照射后各组存活率进行线性拟合,计算出照射后给药组 $LD_{50/30}$ 为9.0 Gy,单纯照射组 $LD_{50/30}$ 为7.6 Gy。DRF值为1.2(图1C)。结果表明 CpG-ODN 可以提高小鼠受照后的存活率。

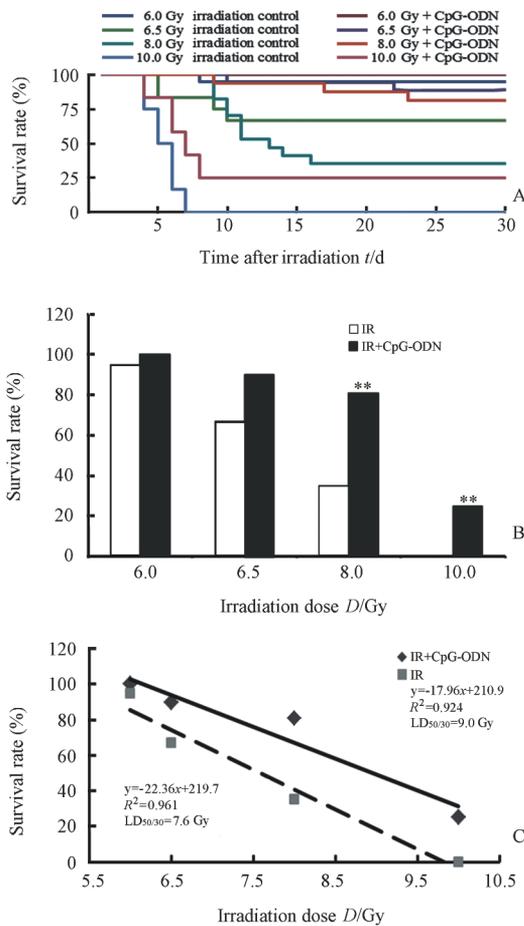


图1 各组小鼠存活情况对比分析结果
Fig 1 Effect of CpG-ODN on survival rates of mice in each group

A: The 30-day survival rates in the irradiation + CpG-ODN group and irradiation alone group after irradiation with various doses; B: Survival rates were evaluated by Kaplan-Meier plots in both groups; C: The survival curves of irradiation + CpG-ODN group and irradiation alone group were drawn and the values of $LD_{50/30}$ were calculated. IR: Irradiation. ** $P < 0.01$ vs IR group ($n = 16-20$)

2.2 外周血白细胞和骨髓有核细胞计数 给予小鼠6.0 Gy照射后,给予不同的处理,在照后1、9、28 d(分别代表初期、极期、恢复期)进行外周血白细胞计数和骨髓有核细胞计数。实验数据显示在照后1、9、28 d照射给药组白细胞含量分别高于对应的单纯照射组(图2A)。骨髓有核细胞计数表明照射后给药组骨髓有核细胞也分别高于对应的单纯照射组,特别是在9 d和28 d(图2B)。结果表明 CpG-ODN 能减少由于照射所致的外周血白细胞和骨髓有核细胞的损伤,并促进其恢复。

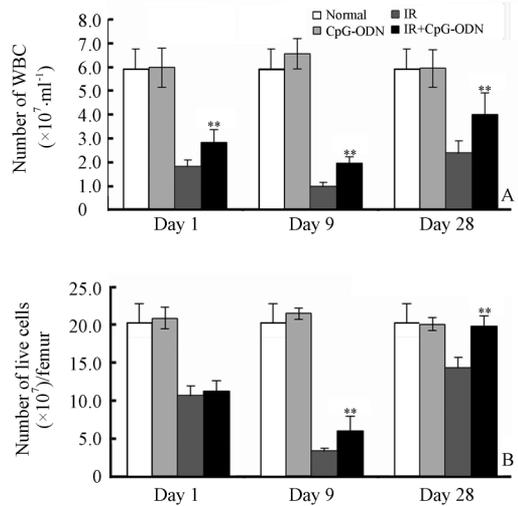


图2 照射后小鼠外周血白细胞计数(A)和照射后小鼠骨髓内有核细胞计数(B)
Fig 2 Numbers of peripheral WBC (A) and bone marrow cells (B) of mice after irradiation

IR: Irradiation(6.0 Gy). ** $P < 0.01$ vs IR group. $n = 6, \bar{x} \pm s$

2.3 骨髓 H-E 染色病理学分析 在照射后1、9、28 d进行骨髓 H-E 染色。实验结果显示:照后1 d,照射给药组和单纯照射组骨髓内细胞都减少,血窦充盈甚至崩塌,小血管扩张(图3A)。照后9 d,单纯照射组骨髓极度空虚、血窦结构模糊、窦壁崩毁、大片出血,照射给药组虽然也出现上述病理学变化,但都相对较轻,并且在骨小梁附近,骨内膜出现新生造血灶(图3B)。照后28 d,照射给药组和单纯照射组的骨髓内新生造血灶增加,骨髓从空虚阶段进入到再生恢复阶段,但其中照射给药组骨髓恢复得更快,骨髓细胞更多(图3C)。这些结果也与骨髓细胞计数的结果一致,说明 CpG-ODN 能减轻受照小鼠的骨髓造血系统损伤。

2.4 外源性脾集落形成单位测定结果 受体小鼠体内形成的脾结节数与注入的骨髓细胞数呈良好的

线性关系,所以脾结节数可以反映供体小鼠骨髓内具有增殖能力的造血干细胞含量。实验结果(图4)显示以照射给药组小鼠骨髓为供体所形成的脾结节

数是以单纯照射组为供体所形成的2.1倍,表明照射给药组小鼠骨髓中具有更多的造血干细胞。

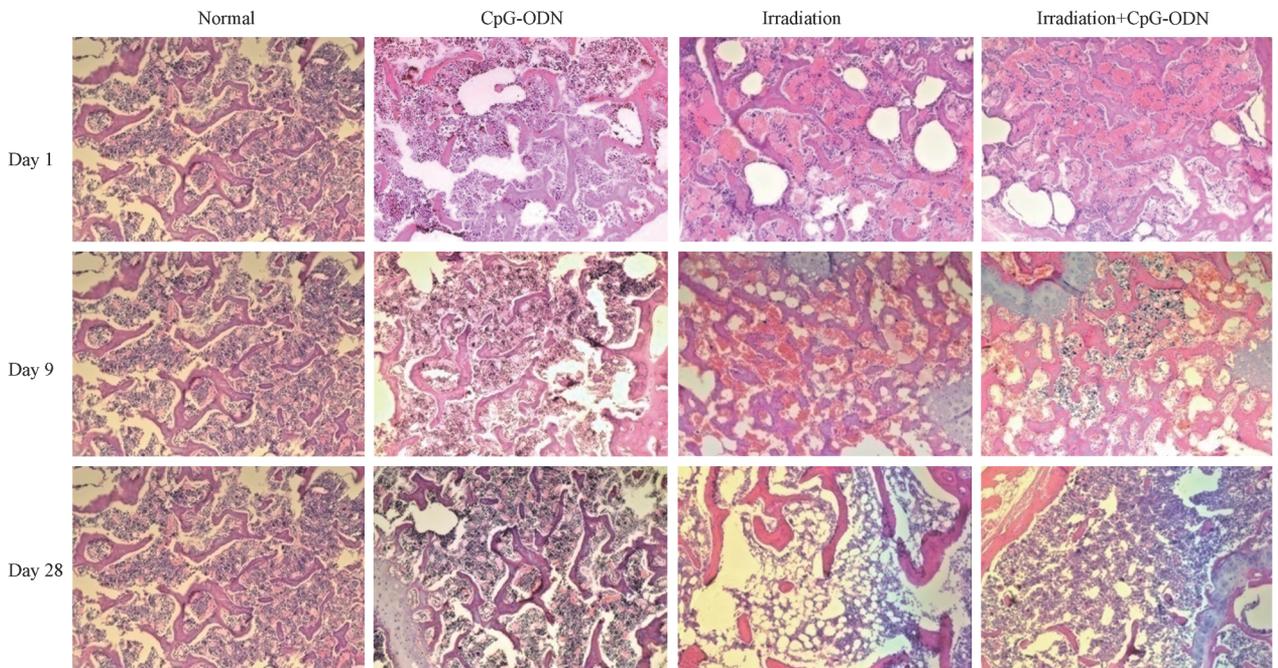


图3 照射后1 d、9 d、28 d小鼠骨髓H-E染色结果

Fig 3 H-E staining of mouse bone marrow preparations at 1 d, 9 d, and 28 d after irradiation

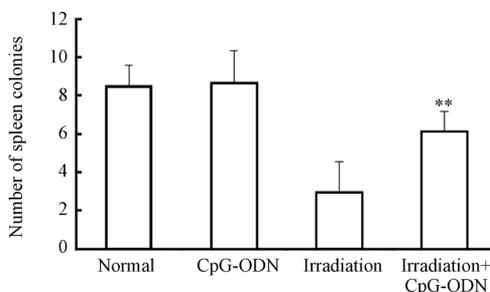


图4 小鼠外源性脾集落形成单位的测定结果

Fig 4 Numbers of CFU-S per femur in each group

** $P < 0.01$ vs irradiation group. $n = 12$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

造血组织是辐射最敏感的组织之一,骨髓等造血组织的辐射损伤,在骨髓性急性放射病以及放疗患者外周血白细胞和血小板降低等的发生中起着关键的作用。造血组织辐射损伤的治疗仍是一个难题,目前缺乏有效的治疗手段和方法。Burdelya等^[5]利用改良型TLR5激动剂激活TLR5信号分子,具有极强的抗辐射损伤效应,即使在照射后2 h给予药物仍然有较好的抗辐射损伤效果。TLR4激动剂LPS对骨髓造血系统和小肠具有很好的改

善辐射损伤的作用^[7]。那么同为TLRs家族激动剂的TLR9激动剂CpG-ODN是否也具有改善辐射损伤的作用?这方面尚未见国内外研究报道。

TLR9是TLRs家族的重要成员之一,其配体激动剂为CpG-ODN。CpG-ODN是含有未甲基化CpG的寡核苷酸片段,是模拟细菌DNA免疫刺激作用的最小作用单位,其结构特点是以非甲基化的胞嘧啶、鸟嘌呤二核苷酸(CpG)为核心的回文序列。细菌DNA分子中CpG基序出现的频率较高,为1:16,而哺乳动物和其他脊椎动物DNA分子中CpG基序出现的频率仅为前者的1/4~1/3,并且60%~90%的CpG胞嘧啶第5碳原子发生甲基化,这种差异使得细菌基因组在进化过程中成为PAMP从而能够被脊椎动物中的TLR所识别,并产生相应的免疫应答^[8]。脊椎动物的免疫系统对CpG-ODN的识别多是通过TLR9实现的。大多数的免疫细胞都会持续表达TLR9,TLR9识别CpG-ODN并与其结合,通过一系列的信号分子转导募集髓样分化标志物MyD88,激活有丝分裂原蛋白激酶磷酸化信号通路。MyD88又使IL-1受体相关激酶(interleukin-1 receptor associated kinase, IRAK)磷酸化,磷酸化的IRAK与肿瘤坏死因子受体相关因子6

(TRAF6)相互作用,通过活化核 NF- κ B 信号转导通路^[3],激活机体免疫细胞及诱导某些细胞因子如 IL-6^[9-10]、TNF- α ^[11]、G-CSF^[12]等的表达和分泌,从而发挥其免疫学活性。

本研究发现,TLR9 激动剂 CpG-ODN 对小鼠造血组织辐射损伤有较好治疗作用,主要表现在:(1)提高大剂量受照小鼠 30 d 存活率,治疗作用明显。8.0、10.0 Gy 不同剂量照射并给予 CpG-ODN 药物组,30 d 存活率分别为 81%、25%,而 8.0、10.0 Gy 单纯照射未用药组的动物,其 30 d 存活率分别为 36%、0,照后给药组存活率显著高于相同剂量单纯照射组($P < 0.01$)。照射给药组 LD_{50/30} 为 9.0 Gy,单纯照射组 LD_{50/30} 为 7.6 Gy。DRF 值为 1.2。(2)减少由于照射所致的外周血白细胞和骨髓有核细胞的降低,并促进其恢复。照射 6.0 Gy 小鼠给予 CpG-ODN 后,在照后 9 d 和 28 d 照射给药组动物外周血白细胞数量分别高于对应的单纯照射组;骨髓有核细胞计数表明照射给药组骨髓内有核细胞也高于对应的单纯照射组,特别是在 9 d 和 28 d。(3)减轻骨髓组织病理变化,加快受损骨髓造血组织再生修复。小鼠 6.0 Gy 照后 9 d,单纯照射组骨髓极度空虚、血窦结构模糊、窦壁崩毁、大片出血。照射给药组虽然也出现上述病理学变化,但病理变化程度相对较轻,并且在骨小梁附近,骨内膜出现新生造血灶;照后 28 d,照射给药组和单纯照射组的骨髓内新生造血灶增加,但其中照射给药组骨髓恢复更快,骨髓有核细胞更多。(4)保护造血干细胞,提高其自我增殖能力。以 6.0 Gy 照射给予 CpG-ODN (50 μ g/只)的小鼠为骨髓供体,受体内所形成的脾结节数量多于以单纯 6.0 Gy 照射的小鼠为供体所形成的脾结节数,表明照射给药组小鼠骨髓中具有更多的造血干细胞。这些表明 CpG-ODN 可以通过减轻造血系统的辐射损伤,促进造血组织和造血干细胞的恢复等途径,提高小鼠受照后的存活率,具有较好的治疗作用。CpG-ODN 减轻造血系统的辐射损伤,促进造血组织和造血干细胞恢复的机制,可能与激活 TLR9 信号通路,促进部分造血相关体液因子分泌,激活 NF- κ B 信号通路有关。NF- κ B 活化除了具有减少细胞损伤的作用外,还具有提高机体抗氧化应激效应的作用^[13]。

综上所述,CpG-ODN 能减轻辐射所致的骨髓造血系统损伤,其机制可能是激活 NF- κ B 促进细胞损伤修复,提高机体抗氧化应激水平和上调一些具有减轻辐射损伤作用的细胞因子促进造血系统辐射损伤的恢复。CpG-ODN 具有与 TLR5 激动剂细菌鞭毛蛋白和 TLR4 激动剂 LPS 相似的改善和减少

辐射损伤的效果。并且与 LPS 和细菌鞭毛蛋白相比,CpG-ODN 毒性更低,获取更容易,所以将其作为一种有效的辐射损伤治疗药用于临床的可行性高,具有较好的发展前景,值得深入探索。

[参考文献]

- [1] Hashimoto C, Hudson K L, Anderson K V. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein[J]. Cell, 1988, 52: 269-279.
- [2] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway C A Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity[J]. Nature, 1997, 388: 394-397.
- [3] Kawai T, Akira S. TLR signaling[J]. Semin Immunol, 2007, 19: 24-32.
- [4] Jurk M, Schulte B, Kritzler A, Noll B, Uhlmann E, Wader T, et al. C-Class CpG ODN: sequence requirements and characterization of immunostimulatory activities on mRNA level[J]. Immunobiology, 2004, 209(1-2): 141-154.
- [5] Burdelya L G, Krivokrysenko V I, Tallant T C, Strom E, Gleiberman A S, Gupta D, et al. An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models[J]. Science, 2008, 320: 226-230.
- [6] Krieg A M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects[J]. Annu Rev Immunol, 2002, 20: 709-760.
- [7] Riehl T, Cohn S, Tessner T, Schloemann S, Stenson W F. Lipopolysaccharide is radioprotective in the mouse intestine through a prostaglandin-mediated mechanism[J]. Gastroenterology, 2000, 118: 1106-1116.
- [8] Barton G M, Kagan J C, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA[J]. Nat Immunol, 2006, 7: 49-56.
- [9] Nardini E, Morelli D, Aiello P, Besusso D, Calcatera C, Mariani L, et al. CpG-oligodeoxynucleotides induce mobilization of hematopoietic progenitor cells into peripheral blood in association with mouse KC (IL-8) production[J]. J Cell Physiol, 2005, 204: 889-895.
- [10] Agrawal S, Gupta S. TLR1/2, TLR7, and TLR9 signals directly activate human peripheral blood naive and memory B cell subsets to produce cytokines, chemokines, and hematopoietic growth factors[J]. J Clin Immunol, 2011, 31: 89-98.
- [11] Lim E J, Lee S H, Lee J G, Chin B R, Bae Y S, Kim J R, et al. Activation of toll-like receptor-9 induces matrix metalloproteinase-9 expression through Akt and tumor necrosis factor-alpha signaling[J]. FEBS Lett, 2006, 580: 4533-4538.
- [12] Zhu F G, Marshall J S. CpG-containing oligodeoxynucleotides induce TNF-alpha and IL-6 production but not degranulation from murine bone marrow-derived mast cells[J]. J Leukoc Biol, 2001, 69: 253-262.
- [13] 郑荣梁, 黄中洋. 自由基生物学[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2007: 96-100.