

CpG ODN 对破骨细胞分化调控作用的研究进展 *

王 静 侯 旭 孙新华[△]

(吉林大学口腔医院正畸科 吉林 长春 130021)

摘要 CpG ODN(CpG oligodeoxynucleotides)是一类可模拟细菌 DNA 免疫活性效应的寡脱氧核苷酸,其生物学功能受自身结构特征影响。特定序列的 CpG ODN 可通过与破骨细胞前体、前破骨细胞、成骨细胞表面的 TLR9 结合,调节 RANKL、M-CSF、TNF- α 、IL-12、TREM-2 等细胞因子的表达水平,促进或抑制破骨细胞的形成与分化。本文就 CpG ODN 对破骨细胞(osteoclast, OC)分化调控作用的研究进展加以综述。

关键词 CpG 寡脱氧核苷酸 破骨细胞 分化 Toll 样受体 9

中图分类号 R329 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2011)17-3390-03

The Current Studies about the Regulation Effect of CpG Oligodeoxynucleotides on Osteoclast Differentiation*

WANG Jing, HOU Xu, SUN Xin-hua[△]

(Department of Orthodontics, Stomatology Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT: CpG ODN is a kind of oligodeoxynucleotides which simulate the immune activity effect of bacterial DNA. Its biological function is decided by its structure characteristics. Specific CpG ODN can stimulate or inhibit the osteoclastogenesis via the toll-like receptors 9 of OC precursors, pre-osteoclasts and Osteoblasts by adjusting the level of RANKL, M-CSF, TNF- α , IL-12, TREM-2. The paper reviews introduces current studies about CpG oligodeoxynucleotides and its regulation effect on osteoclast differentiation.

Key words: CpG oligodeoxynucleotides; Osteoclastogenesis; Differentiation; Toll-like receptors 9

Chinese Library Classification(CLC): R329 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)17-3390-03

CpG ODN 是指富含 CpG 基序的单链寡脱氧核苷酸,全长包括 20~50 个碱基。已有的研究表明 CpG ODN 具有抗过敏、抗感染、抗肿瘤,以及调节免疫反应等多种作用,目前已成功应用于基因疫苗佐剂开发、抗肿瘤药物研发、抗感染性疾病、过敏性疾病及免疫缺陷性疾病的临床前研究等方面。CpG ODN 具有高效、低毒、无需载体搭载即可进入细胞发挥作用等优势,同时其性质稳定且易于人工合成,因此近二十年来备受关注。近年来有学者又发现 CpG ODN 具有调节破骨细胞分化的作用,本文针对 CpG ODN 及其对破骨细胞分化调控作用的相关研究及进展作如下综述。

1 CpG ODN 起源及定义

早在 19 世纪 90 年代,人们发现菌体粗提制剂可使癌症患者的肿瘤明显退缩,后来 Tokunaga 等用卡介苗进行小鼠体内实验,发现菌体中抗肿瘤的活性成分为脱氧核糖核酸(desoxyribonucleic acid, DNA)^[1]。随后,大量研究证实细菌 DNA 具有抗肿瘤及直接免疫刺激的特性。进一步序列分析显示,凡具有免疫活性的核苷酸序列中至少含有一个或多个 -CG- 二核苷酸,CG 之间是以磷(p)相连的,且 dC 的第 5 位碳原子未被甲基化,所以把这种含有非甲基化的胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸(CpG)的

DNA 统称 CpG DNA,含有 CpG 的寡脱氧核苷酸序列(ODN)统称为 CpG ODN (CpG oligonucleotide);又因为其可以模拟细菌 DNA 活性,激活多种免疫效应细胞,直接刺激 B 细胞、T 细胞、NK 细胞和专职抗原提呈细胞参与的免疫调节级联反应,产生强烈偏向 Th1 型的保护性免疫应答,CpG ODN 也被称为免疫刺激 DNA 序列(Immun stimulatory DNA sequence, ISS)。

2 CpG ODN 结构及分类

CpG ODN 的生物学功能受自身结构特征影响。任何原因引起的 CpG 二核苷酸的缺失、逆转及胞嘧啶的甲基化均可导致其活性丧失,表明非甲基化的 CpG 二核苷酸是其免疫刺激活性的基础。此外,骨架的长度、硫代化修饰、侧翼序列、末端修饰等因素也一定程度的影响其活性。

根据 CpG ODN 结构及其对外周血单个核细胞的刺激作用不同,将具有免疫刺激作用的 CpG ODN 分为三种类型:A 型(或 D 型)、B 型(或 K 型)和 C 型^[2]。A 型 CpG ODN 为磷酸二酯骨架,多聚 G(Poly G)位于 3' 和 / 或 5' 末端且该部位常有部分硫代修饰。其免疫刺激作用主要是激活 pDC 分泌大量 IFN- α ,活化 NK 细胞,分泌 IFN- γ ;促使 APC 成熟等,但几乎不活化 K 型 B 细胞。B 型 CpG ODN 为全硫代修饰骨架,拥有

* 基金项目:吉林省自然科学基金(201015203)

作者简介:王静(1985-)女,硕士,医师,主要研究方向:牙齿移动生物学。联系电话:13610720915, E-mail: wj850720@163.com

侯旭(1980-)女,博士,医师,主要研究方向:牙齿移动生物学。联系电话:0431-88796023, E-mail: 27712648@qq.com

[△]通信作者:孙新华,电话:0431-88796023, E-mail: xinhua8@163.com

(收稿日期:2011-02-07 接受日期:2011-02-28)

多个 CpG 基序,但没有主要的二级结构。其免疫刺激作用主要是激活 B 细胞使其分化增殖,产生 IL-6、TNF- α 、IgM;促使 pDC 成熟,表达共刺激分子,分泌 IFN- α 。C 型 CpG ODN 也为全硫代修饰骨架,但其中间或 3' 末端有互补回文结构,能形成双链/茎环结构。兼有 A 型和 B 型 CpG ODN 的免疫刺激活性,既能激活 pDC 分泌高水平的 IFN- α ,又能激活 B 细胞活化增殖。

3 CpG ODN 进入细胞的途径

现已研究证实,CpG ODN 主要以胞吞的形式进入细胞内,无需载体搭载,进入细胞后通过与 Toll 样受体 9 (Toll-like receptors 9, TLR9) 结合激活信号传导级联反应发挥作用。TLR9 属于微生物天然免疫模式识别受体 Toll 家族 (Toll-like receptors, TLRs)中的一员,是一种定位于细胞内体(endosome)囊膜上的受体,主要存在于单核细胞、B 淋巴细胞和细胞样树突状细胞等抗原提呈细胞中,识别细菌或病毒来源的双链 DNA、非甲基化 CpG ODN 及自身来源的核染色质-IgG 复合物等。CpG ODN 受磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)作用内化后与细胞内小泡中的 TLR9 特异性结合,激活信号传导级联反应,信号传递依次经过髓样细胞分化蛋白(myeloid differentiation protein 88, MYD88)、白介素 1 受体相关激酶(IL-1-receptor-associated kinase, I-RAK)和肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6),最终导致核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)、激活蛋白 1(activator protein 1, AP1)、环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)等多种转录因子的激活,进而上调某些细胞因子和趋化因子的表达水平。

此外,CpG ODN 还可以通过其他非 TLR9 依赖方式进入细胞发挥作用^[3],但其作用机制目前尚不明确。

4 CpG ODN 对破骨细胞分化调控的作用及其机制

OC 源于造血干细胞,其形成与分化主要通过 NF- κ B 受体活化因子配体(receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL)/NF- κ B 受体活化因子(receptor activator of NF- κ B, RANK)/骨保护素(osteoprotegerin, OPG)和 TNF- α /IL-1 两种机制^[4],经过 NF- κ B 通路、丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路、磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase, PI3K/Akt)通路或钙调磷酸酶/活化 T 细胞核因子(Calcineurin/Nuclear factor of activated T-cells, CN/NFAT)等信号转导通路调控。其中,OPG、RANKL 及 RANK 是 OC 的最终调节因子,也是 OC 分化的主要调控机制,因为目前已证实的可影响 OC 分化的多种内分泌激素和细胞因子如活性维生素 D3 (1,25 (OH)₂D₃)、雌激素、甲状旁腺素(PTH)、前列腺素(PGE₂)、IL-4、IL-6、IL-11、IL-12 等均通过调节 OPG、RANKL 和 RANK 之间的比例,介导 OC 生成并维持其功能。成熟的 OC 可造成骨质吸收,在关节炎、骨髓炎、牙周病引起的牙槽骨质吸收等疾病的发生、发展中起了重要作用。早在十九世纪,有学者提出将细菌 DNA 间接注入关节可引发关节炎,造成关节骨、软骨破坏,而将其注入佐剂诱发性关节炎、类风湿性关节炎等关节炎模型时,发现其有促进炎

症发展、加快骨质破坏的作用^[5-7],这些研究结果表明 CpG ODN 可在一定程度上影响 OC 的分化与活化。同时有研究证实,不含 CpG 的寡脱氧核苷酸无此活性,说明 CpG ODN 对 OC 分化的影响作用具有特异性^[8]。

4.1 CpG ODN 对破骨细胞分化的影响作用

4.1.1 CpG ODN 作用于破骨细胞前体并影响其分化 大量研究证实,OC 表面表达有 TLR9^[9],CpG ODN 可通过与 TLR9 结合的经典途径进入 OC 细胞内调控其分化^[9,10]。ZOU 等学者研究表明 CpG ODN 对 OC 分化形成具有双重作用,即在早期破骨细胞前体(OC precursors, OCPs)阶段,CpG ODN 通过下调巨噬细胞集落刺激因子(macrophage-colony stimulating factor, M-CSF)抑制生理性 OC 分化因子 RANKL 的激活,进而抑制 OC 分化,而在细胞核因子 κ B 受体活化因子配体(receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL)预处理的前破骨细胞(pre-osteoclasts, pOCs)中,CpG ODN 促使肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和 RANKL 的表达增加,强烈刺激 OC 分化^[9]。赵为公等将小鼠骨髓单核细胞分别与 M-CSF、M-CSF+RANKL、M-CSF+不同浓度 CpG ODN 相互作用,发现 CpG ODN 可诱导骨髓单核细胞分化为 TRAP 阳性 OC,且随 ODN 浓度增加、培养时间延长,OC 分化因子 TNF- α 表达增加,表明 CpG ODN 刺激 OC 的分化及成熟^[11]。最近,有学者研制出一种新型 CpG ODN-CpG-KSK13,通过将其与小鼠 CpG-1826 和人类 CpG-2006 的 OC 分化作用相比较,发现该基序对早期破骨细胞前体和经 RANKL 预处理的前破骨细胞的分化均表现强烈的抑制作用^[12]。

4.1.2 CpG ODN 作用于成骨细胞,间接影响破骨细胞分化 CpG ODN 可促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化,且可通过 TLR9 调控骨髓细胞/成骨细胞共同培养基中的 OC 形成。成骨细胞(Osteoblasts, OB)源于多能的骨髓基质细胞,是骨形成的主要功能细胞,负责骨基质的合成、分泌和矿化,还可表达 RANKL、TNF- α 等骨吸收细胞因子,在调控 OC 分化、活化中发挥了重要作用。研究表明,CpG ODN 可促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化^[13,14]。而 OB 表面表达有 TLR9,CpG ODN 与 OB 相互作用,使细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated protein kinase, ERK)、P38 磷酸化,激活 NF- κ B,合成释放 TNF- α ,增强 M-CSF 的表达,进一步调控 OC 分化形成,但该作用的发挥受氯喹抑制,需要内涵体的成熟/酸化^[8]。且有学者将 CpG ODN 作用于正常的和 TLR9 缺陷的小鼠 OB,发现 CpG ODN 对 TLR9 缺陷的细胞不发挥任何刺激作用,提示 CpG ODN 是通过与 TLR9 结合这一经典途径来调控成骨破骨平衡。然而有研究表明,与 CpG ODN 介导破骨细胞前体和前破骨细胞的分化作用相比,其以 OB 为靶点,调控 OC 分化的作用相对较弱^[10]。

4.2 特定序列的 CpG ODN 调控 OC 分化的作用机制

4.2.1 特定序列的 CpG ODN 促进 OC 分化的机制 众所周知,RANKL 和 M-CSF 是 OC 调控分化的关键因子,且研究证实 RANKL、TNF- α 、IL-1、IL-6、1,25-(OH)₂D₃、PTH、M-CSF 等对破骨细胞的成熟分化起促进作用。在经 RANKL 预处理的前破骨细胞中加入 CpG ODN,RANKL 和 TNF- α ^[15]表达均显著增加,且随 CpG ODN 浓度增加和作用时间的延长,两种细胞因子的表达水平也随之增加,OC 分化形成明显^[9,11]。而 OB 与 CpG

ODN 相互作用促进 OC 分化时, RANKL、M-CSF、TNF- α 表达也有所增加, 影响成骨-破骨平衡^[8]。表明 CpG ODN 对 OC 分化的促进作用可能与上述两种调控机制相关。

4.2.2 特定序列的 CpG ODN 抑制 OC 分化的机制 在未经 RANKL 预处理的破骨细胞前体中加入 CpG ODN, 虽然同样介导 ERK、P38 磷酸化, 激活 NF- κ B, 释放 TNF- α , 但 OC 分化受抑制。ZOU 等研究认为该现象的出现与此时 M-CSF 表达下调有关^[9]。Alla 等通过研究 RANKL、CpG ODN 及它们的混合物对破骨细胞前体的作用发现, 白介素-12(interleukin-12, IL-12) 的 mRNA 表达水平显著增强, 其可抑制 TNF- α 介导的 OC 分化^[16], 且特异性抗 IL-12 抗体可抑制 CpG ODN 的抗 OC 分化作用, 表明 CpG ODN 可通过合成释放 IL-12 抑制 OC 分化, 但又由于抗 IL-12 抗体不能完全抑制 CpG ODN 的抗 OC 分化功能, 意味着 CpG ODN 还可通过其他途径抑制 OC 分化^[17]。随后有学者研究发现, 虽然 CpG ODN 可使早期破骨细胞前体的 ERK 发生磷酸化, 但该磷酸化却从持续磷酸化转变为暂时磷酸化, 这种转变的结果是 c-fos 表达降低, c-fos 是调控 RANKL 的重要分子, 缺少 c-fos 原位基因的小鼠患有骨硬化症, 由于 c-fos 的缺少可使 OC 和巨噬细胞谱系间发生转换, 最终导致 BMMs 细胞数目增多, 从而证实 CpG ODN 可通过诱导 ERK 暂时磷酸化抑制 OC 分化^[18]。最新研究发现 CpG-KSK13 可通过下调 OC 形成相关因子 TREM-2^[19], 对 BMMs 和经 RANKL 预处理的前破骨细胞中均表现强烈的 OC 分化抑制作用^[12]。

5 展望

CpG ODN 已成功应用于基因疫苗佐剂、抗肿瘤、抗感染性疾病、过敏性疾病及免疫缺陷性疾病等疾病的临床前研究中。而近来的研究发现特定序列的 CpG ODN 可与 OC 及 OB 表面的 TLR9 结合, 通过调节 RANKL、M-CSF、TNF- α 、IL-12、TREM-2 等细胞因子的表达水平及 ERK 去磷酸化, 直接或间接影响 OC 的体外分化。如能进一步明确 CpG ODN 对 OC 分化的调控作用与机制, 将不仅为 CpG ODN 开辟新的医学应用领域, 也将有助于完善机体的免疫-骨调节网络, 为骨代谢性疾病的防治提供新的理论依据。

参考文献(References)

- [1] Tokunaga T, Yano O, Kuramoto E, et al. Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of Mycobacterium bovis BCG induce interferon and activate natural killer cells[J]. Microbiol Immunol, 1992,36(1):55-66
- [2] Marshall JD, Fearon K, Abbate C, et al. Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions [J]. J Leukoc Biol, 2003,73(6):781-792
- [3] Andor Pivarsci. Toll-Like Receptor 9-Independent Suppression of Skin Inflammation by Oligonucleotides [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2007,127: 746-748
- [4] Kobayashi Y, Udagawa N, Takahashi N. Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis [J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2009,19(1): 61-72
- [5] Arash Ronaghy, Berent J. Prakken, Kenji Takabayashi, et al. Immunostimulatory DNA Sequences Influence the Course of Adjuvant Arthritis1[J]. The Journal of Immunology, 2002,168:51-56
- [6] Dennis Klinman, Hidekazu Shirota, Debra Tross, et al. Synthetic oligonucleotides as modulators of inflammation [J]. J Leukoc Biol, 2008,84(4):958-964
- [7] Weronika Rudnicka, Tomasz Burakowski, Ewa Warnawin. Functional TLR9 modulates bone marrow B cells from rheumatoid arthritis patients[J]. Eur. J. Immunol, 2009,39:211-220
- [8] Wei Zou, Alla Amcheslavsky, and Zvi Bar-Shavit. CpG oligodeoxynucleotides modulate the osteoclastogenic activity of osteoblasts via toll-like receptor 9 [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003,278(19):16732-16740
- [9] Wei Zou, Harry Schwartz, Stefan Endres, et al. CpG oligonucleotides: Novel regulators of osteoclast differentiation [J]. FASEB J, 2002,16: 274-282
- [10] Alla Amcheslavsky, Hiroaki Hemmi, Shizuo Akira, et al. Differential Contribution of Osteoclast- and Osteoblast-Lineage Cells to CpG-Oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) Modulation of Osteoclastogenesis[J]. J Bone Miner Res, 2005, 20:1692-1699
- [11] 赵为公, 韩学哲, 刘森, 等. 富含 CpG 的脱氧核苷酸片段对破骨细胞形成的调节作用[J]. 第四军医大学学报, 2004,25 (15):1386-1388
- [12] Zhao Wei-Gong, Han Xue-Zhe, Liu Miao, et al. CpG oligonucleotides in mediating osteoclast differentiation[J]. Journal of The Fourth Military Medical University, 2004,25(15):1386-1388
- [12] Jae-Ho Chang a, Eun-Ju Chang c, Hong-Hee Kim c, et al. Enhanced inhibitory effects of a novel CpG motif on osteoclast differentiation via TREM-2 down-regulation [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009,389:28-33
- [13] 申玉芹, 孙新华, 于丽, 等. 不同 CpG ODN 对大鼠骨髓间充质干细胞增殖作用的研究[J]. 口腔医学研究, 2009,25(6):723-725
- [13] Shen Yu-qin, Sun Xin-hua, Yu Li, et al. Effect of Synthesized CpG ODN Sequences on the Proliferation of Rats Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells [J]. Journal of Oral Science Research, 2009,25 (6):723-725
- [14] 申玉芹, 孙新华, 于丽, 等. 小寡核苷酸对大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的影响 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2010,36(2): 336-339
- [14] Shen Yu-qin, Sun Xin-hua, Yu Li, et al. Effect of oligodeoxynucleotide on differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells to osteoblasts[J]. Journal of Jilin University(Medicine Edition), 2010,36(2):336-339
- [15] Amcheslavsky Alla, Wei Zou, Bar-Shavit Zvi. Toll-like receptor 9 regulates tumor necrosis factor- α expression by different mechanisms-Implications for osteoclastogenesis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004,279(52): 54039-54045
- [16] Masako Yoshimatsu, Hideki Kitaura, et al. IL-12 inhibits TNF- α induced osteoclastogenesis via a T cell-independent mechanism in vivo [J]. Bone, 2009,45(5):1010-1016
- [17] Alla Amcheslavsky, Zvi Bar-Shavit. Interleukin (IL)-12 Mediates the Anti-Osteoclastogenic Activity of CpG- Oligodeoxynucleotides [J]. Journal of Cellular Physiology, 2006,207:244-250
- [18] Alla Amcheslavsky, Zvi Bar-Shavit. Toll-Like Receptor 9 Ligand Blocks Osteoclast Differentiation Through Induction of Phosphatase [J]. J Bone Miner Res, 2007,22:1301-1310
- [19] Colonna M, Turnbull I, Klesney-Tait J. The enigmatic function of TREM-2 in osteoclastogenesis [J]. Adv Exp Med Biol, 2007,602: 97-105