

· 基础研究 ·

IgG在CpG DNA诱导巨噬细胞活化与JNK和p38通路中的作用

向莉平^{1,2}, 钱颐森¹, 杨楚楚¹, 陈昱宁¹, 尤书慧¹, 冯振卿^{1*}, 张 茜^{1*}¹南京医科大学国家卫健委抗体技术重点实验室, ²免疫学系, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的:探究免疫球蛋白G(IgG)在CpG DNA诱导巨噬细胞活化过程中的调节作用及其对信号通路的影响。方法:体外培养小鼠骨髓源巨噬细胞,采用流式细胞仪和免疫荧光技术对巨噬细胞表面标志物和吞噬功能进行鉴定。IgG、CpG DNA以及IgG联合CpG DNA分别处理巨噬细胞后,采用流式细胞技术检测巨噬细胞表面活化分子及胞内细胞因子,免疫蛋白印迹检测核因子(nuclear factor, NF)- κ B和MAPK信号通路相关蛋白磷酸化。结果:体外培养巨噬细胞表面标志物CD11b和F4/80的表达率约99.7%,巨噬细胞对FITC-IgG吞噬比例约70%;IgG上调CpG DNA活化巨噬细胞表面CD40、CD80和CD86的表达($P < 0.05$);IgG促进CpG DNA诱导巨噬细胞内JNK和p38磷酸化,但对ERKp44/42和NF- κ Bp65的磷酸化没有明显作用;IgG联合CpG DNA诱导巨噬细胞分泌大量的细胞因子肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 。结论:IgG在CpG DNA诱导巨噬细胞活化与MAPK信号通路JNK和p38磷酸化中起促进作用,通过促使表达上调共刺激分子CD40、CD80和CD86与分泌TNF- α 进一步活化巨噬细胞。

[关键词] IgG; CpG DNA; 巨噬细胞; 活化作用; TNF- α **[中图分类号]** R392.9**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)08-1112-06**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190804

The roles of IgG in CpG DNA activated macrophages and induction of JNK and p38 pathways

Xiang Liping^{1,2}, Qian Yisen¹, Yang Chuchu¹, Chen Yuning¹, You Shuhui¹, Feng Zhenqing^{1*}, Zhang Qian^{1*}¹Key Laboratory of Antibody Techniques, National Health Commission, ²Department of Immunology, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the effect of IgG on activating signaling pathway of macrophages induced by CpG DNA. **Methods:** Bone - marrow derived macrophages were cultured *in vitro* and their surface markers and phagocytic functions were identified by flow cytometry and immunofluorescence technique. After the treatment of macrophages with IgG, CpG DNA and IgG plus CpG DNA, the activated molecules on the surface of macrophages were detected by flow cytometry, and the protein phosphorylation was detected by immuno-protein Western blot. **Results:** The expression rate of CD11b and F4/80 on the surface of macrophage *in vitro* was about 99.7%, and the proportion of macrophage to FITC - IgG was about 70%; IgG up-regulated the expression of CD40, CD80 and CD86 on the surface of macrophage induced by CpG DNA ($P < 0.05$); IgG promotes the phosphorylation of JNK and p38 in macrophages induced by CpG DNA, but it has no effect on the phosphorylation of ERK and NF- κ B; CpG DNA induces macrophages to secrete TNF- α , and combination of IgG with CpG DNA enhanced this process. **Conclusion:** CpG DNA activates macrophages and increases the phosphorylation of JNK and p38, and the combined treatment of CpG DNA and IgG highly induced this process; CpG DNA increased the co-stimulation molecule of CD40, CD80 and CD86 on the surface of macrophages, while the co-therapy of IgG and CpG DNA highly up-regulates this expression.

[Key words] IgG; CpG DNA; macrophage; activation; TNF- α

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(08): 1112-1117]

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(31700793);南京医科大学科技发展重点项目(2016NJMUZD007)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: fengzhenqing@njmu.edu.cn; zhangqian01@njmu.edu.cn

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种以血清中含有高水平自身抗体和多脏器损害为临床特征表现的全身性慢性自身免疫性疾病^[1]。据报道,免疫球蛋白G(IgG)抗体介导的补体激活与Fc受体(FcR)途径是先天免疫系统保护宿主免受感染的重要机制。在SLE自身免疫性疾病中,IgG型抗体形成的免疫复合物是SLE自身免疫性疾病致病的重要因素之一^[2],但具体机制尚不清楚。目前为止,关于SLE发病机制的研究大多集中于适应性免疫应答的T、B淋巴细胞上^[3]。骨髓源巨噬细胞(bone marrow-derived macrophage, BMM)来源于骨髓源成熟的单核细胞,在吞噬、清除凋亡细胞和特异性抗原提呈过程中发挥重要作用。巨噬细胞作为抗原提呈细胞,活化后高表达协同共刺激分子CD40、MHC、CD80和CD86,活化的巨噬细胞释放炎症因子介导组织损伤。自身免疫病中细胞凋亡失调是重要的致病因素,巨噬细胞对凋亡细胞的清除受损,凋亡细胞DNA甲基化水平显著低于正常DNA^[4],且与正常人相比,SLE活动期患者外周血单个核细胞尤其是CD4⁺T细胞含有更多的低甲基化DNA^[5],提示凋亡DNA与非甲基化的CpG DNA很可能具有类似的胞内受体或活化信号转导机制^[6]。CpG DNA主要通过与其胞内的Toll样受体9(Toll-like receptor 9, TLR9)结合招募MyD88样适配蛋白最终活化MAPK和核因子(nuclear factor, NF)- κ B信号转导通路,释放大量原发性致炎因子,参与机体炎症反应,进而参与SLE疾病的发展^[7]。基于此,本实验以小鼠BMM为模型,探讨人外周血分离的IgG在CpG DNA诱导巨噬细胞活化与信号通路中的作用,从而为SLE的发病机制提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

6~8周C57BL/6雌性小鼠(南京医科大学SPF级医药实验动物中心),体重15~20g;CpG DNA序列号:5'-TCCATGACGTTCTGATGCT-3';人IgG(36110ES60,上海翊圣公司);人FITC-IgG(Sigma公司,美国);DMEM培养基、胎牛血清(Gibco公司,美国);巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)(PeproTech公司,美国);p-JNK、p-ERK、p-P38、p-Akt、p-NF- κ B、JNK、ERK和Akt抗体(CST公司,美国);p38抗体(ab32142, Abcam公司,美国);GAPDH抗体(30201ES20,上海翊圣公司);

流式抗体APC-CD11b(Clone: M1/70)和PE-F4/80(BM8)(Biolegend公司,美国);FITC-MHC II(Clone: In-1)(BD Biosciences公司,美国);PE-CD40(Clone: 1C10)、APC-CD80(Clone: 16-10A1)、PE-CD86(PO3.1)和APC-TNF- α (MP6-XT22)(eBioscience公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠BMM培养

小鼠颈椎脱臼处死后,75%酒精浸泡5 min,用DMEM培养基冲出胫骨与股骨骨髓,重悬,1 500 r/min离心5 min,红细胞裂解2 min,预冷PBS终止,离心,PBS清洗1次,1 500 r/min离心5 min,加入10 mL DMEM(含10% FBS)培养基于37 °C 5% CO₂条件下放置3 h。取悬浮细胞,加入30 ng/mL M-CSF 10% FBS DMEM(含2 mmol/L L-谷氨酰胺,100 U/mL青霉素与100 μ g/mL链霉素)于10 cm平皿中培养3 d,铺板相同条件下继续培养3 d。

1.2.2 免疫荧光检测BMM吞噬功能

BMM细胞 2×10^5 个/孔种于48孔培养板,用FITC-IgG处理2 h,对照组加入等量的培养基,每组设3个复孔,实验重复3次。PBS清洗细胞3次,4%多聚甲醛固定10 min, PBS清洗3次,0.1% Triton X-100通透5 min, PBS清洗3次,1% BSA封闭10 min,按说明书加入Phalloidin-TRITC(20 μ mol/L),室温避光孵育30 min, PBS清洗3次,加入DAPI(1:100 000) 5 min,正置荧光显微镜观察。

1.2.3 流式细胞术检测BMM表面分子标志物和表面活化分子的表达

将BMM按 1×10^6 个/孔的密度铺于12孔培养板中,分别用IgG(100 μ g/mL)、CpG DNA(终浓度0.3 μ mol/L)、CpG DNA联合IgG处理24 h,对照组加入等量的培养基,每组设3个复孔,实验重复3次。24 h后弃培养上清,预冷的PBS清洗2次,胰酶消化后,用DMEM培养基收集细胞于EP管中,1 500 r/min离心5 min,弃上清,PBS重悬细胞,1 500 r/min离心5 min,分别加入荧光素标记的抗体PE-F4/80、APC-CD11b、PE-CD40、FITC-MHC II、APC-CD80、PE-CD86和APC-TNF- α ,抗体终浓度为1 μ g/mL,4 °C条件下避光放置40 min后用PBS洗涤,重悬于200 μ L PBS中,Beckman流式细胞仪上机检测,FlowJo7.6进行数据分析。

1.2.4 免疫蛋白印迹法检测相关信号通路蛋白磷酸化

将BMM按 1×10^6 个/孔的密度铺于12孔培养

板中,分别用IgG(100 μg/mL)、CpG DNA(终浓度0.3 μmol/L)、CpG DNA与IgG处理30 min,同时对对照组加入等量的培养基,每组设3个复孔,实验重复3次。用蛋白裂解液提取细胞总蛋白,BCA蛋白定量试剂进行蛋白量归一化,100 °C蛋白变性5 min,上样。按浓缩胶60 V 30 min,分离胶110 V 90 min电泳,PVDF膜0.2 A 2 h湿转膜。用5%脱脂奶粉溶液室温封闭60 min。分别加入一抗p-JNK(1:1 000)、p-ERK(1:2 000)、p-p38(1:1 000)、p-Akt(1:1 000)、p-NF-κB(1:1 000)、JNK(1:1 000)、ERK(1:1 000)、p38(1:1 000)、Akt(1:1 000)和GAPDH(1:5 000)4 °C孵育过夜,TBST洗涤后加入相应二抗,室温孵育1 h,TBST洗涤后,将ECL发光显色后,用Tanon5200成像系统采集图像。

1.3 统计学方法

所有统计分析采用GraphPad PRISM.6软件,计量数据表述采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$),组间比较采用方差分析(ANOVA)或*t*检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统

计学意义。

2 结果

2.1 BMM表面标志物检测

培养约6 d的小鼠BMM经荧光标记的CD11b和F4/80抗体染色后流式细胞仪检测,发现CD11b和F4/80表达阳性率达99.7%(图1)。

2.2 BMM吞噬功能鉴定

BMM是体内主要发挥吞噬摄取作用的细胞,为观察BMM对FITC-IgG的吞噬作用,将小鼠BMM与FITC-IgG孵育2 h后进行免疫荧光染色。BMM对FITC-IgG具有吞噬作用,吞噬比例约为70%(图2)。

2.3 IgG对BMM增殖的影响

为了检测人外周血提取的IgG是否会影响BMM的增殖,使用不同剂量的IgG与相同浓度的M-CSF共同培养BMM,然后使用CCK-8试剂盒进行波长为450 nm的吸光度值检测。发现IgG对BMM的增殖无明显作用(图3)。

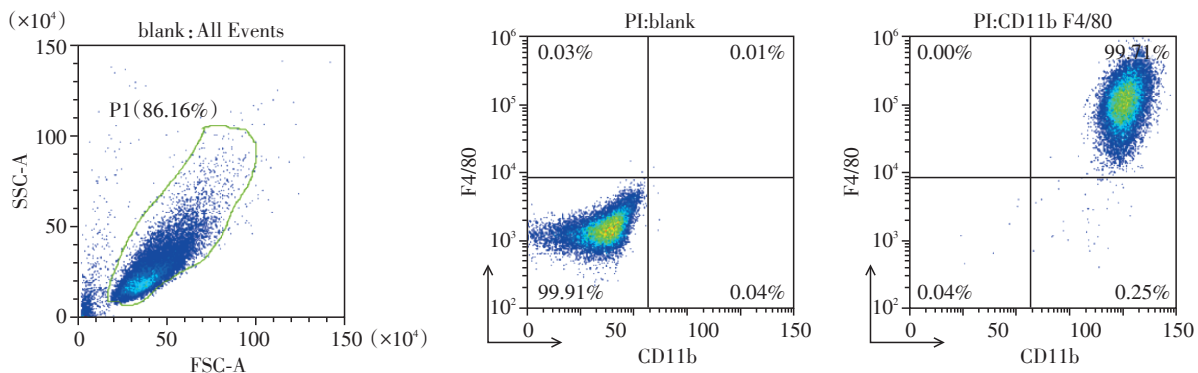
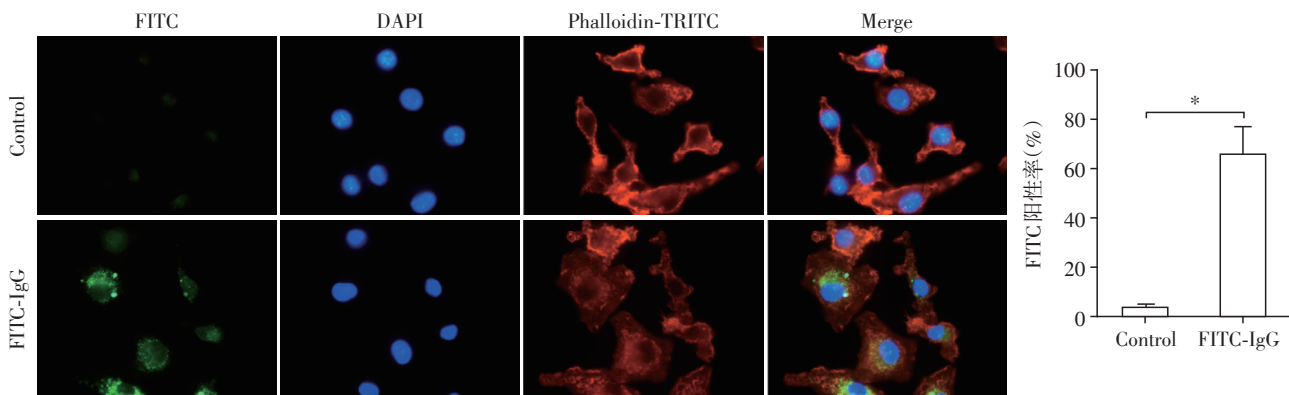


图1 体外培养小鼠BMM CD11b和F4/80的表达

Figure 1 The expression of CD11b and F4/80 in cultured BMM *in vitro*



两组比较,* $P < 0.01$ ($n=3$)。

图2 BMM对FITC-IgG的吞噬作用($\times 1\ 000$)

Figure 2 Phagocytosis of BMM on FITC-IgG($\times 1\ 000$)

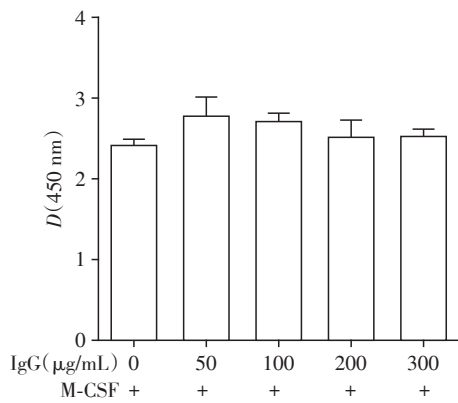


图3 IgG对BMM增殖的影响

Figure 3 The effect of different concentrations of IgG on BMM proliferation

2.4 IgG上调CpG DNA对BMM表面活化分子的表达

为了研究IgG是否会影响CpG DNA诱导的BMM表面协同共刺激分子的表达,分别加入IgG、CpG DNA、CpG DNA和IgG刺激BMM 24 h。结果如图4所示,CpG DNA体外刺激BMM能够活化其表面CD40、MHC II、CD80和CD86的表达,其中CD40、CD80和CD86的活化具有统计学差异($P < 0.05$),而MHC II与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。IgG联合CpG DNA处理后可进一步促进CpG DNA活化巨噬细胞表面分子CD40、MHC II、CD80和CD86表达,其中CD40、CD80和CD86的表达上调具有统计学意义(P 均 < 0.05),MHC II的改

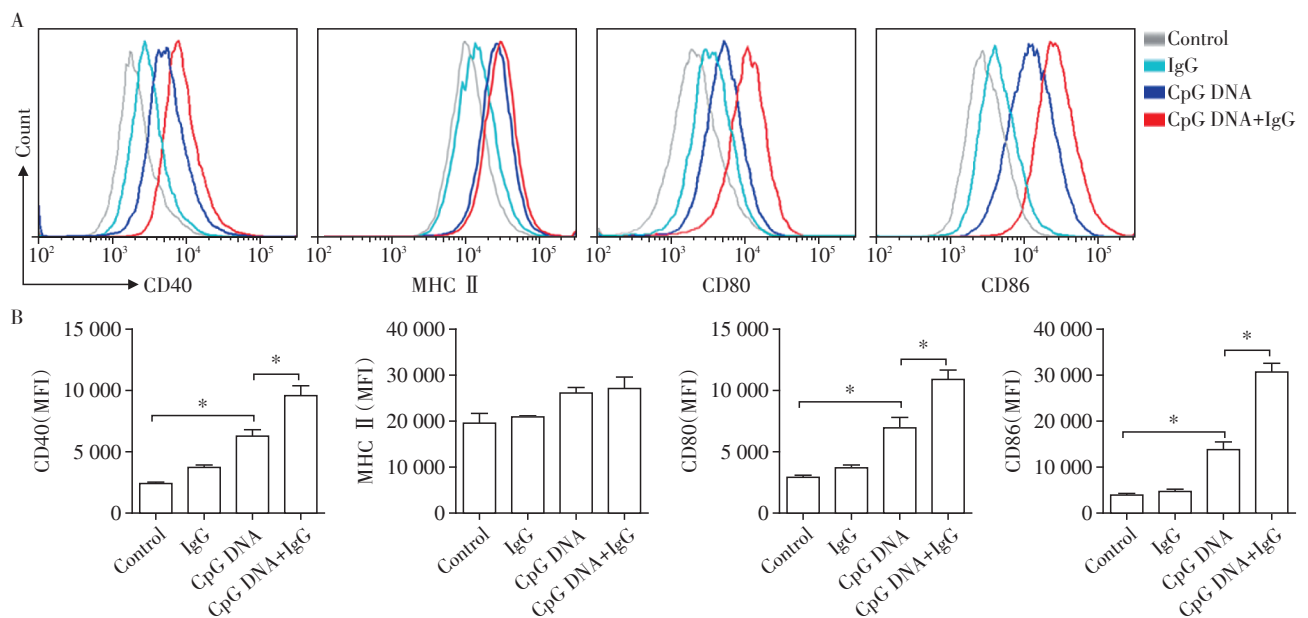
变差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.5 IgG促进CpG DNA诱导BMM MAPK (JNK和p38)的磷酸化

为了进一步探究IgG在CpG DNA诱导BMM MAPK和NF- κ B活化中的作用,接下来分别使用IgG、CpG DNA、CpG DNA+IgG刺激BMM 30 min。结果如图5所示,CpG DNA活化BMM后可诱导MAPK (ERKp44/42、p38和JNK)途径活化。且IgG能够促进CpG DNA诱导BMM JNK和p38的磷酸化,但对ERKp44/42磷酸化无明显促进作用,提示IgG与CpG DNA在诱导BMM JNK和p38通路活化中具有协同作用,从而共同上调BM表面CD40、MHC II、CD80和CD86的表达。IgG和CpG DNA均能引起NF- κ B的磷酸化,但两者并没有联合促进作用(图5),因此,IgG在CpG DNA诱导的BMM NF- κ B磷酸化中无明显作用。以上结果表明IgG在CpG DNA诱导BMM活化可能是通过JNK和p38通路而不是NF- κ B途径。

2.6 IgG促进CpG DNA诱导的BMM分泌肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)

为了进一步研究IgG在CpG DNA诱导BMM分泌细胞因子中的作用,用IgG、CpG DNA、CpG DNA联合IgG刺激BMM 20 h。利用细胞流式仪检测细胞表面和胞内细胞因子TNF- α 与 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)的分泌。结果如图6,IgG能够引起



两组比较,* $P < 0.05$ ($n=3$)。

图4 IgG促进CpG DNA活化BMM表面分子表达上调

Figure 4 IgG up-regulated the surface molecular expression in CpG DNA-activated BMM

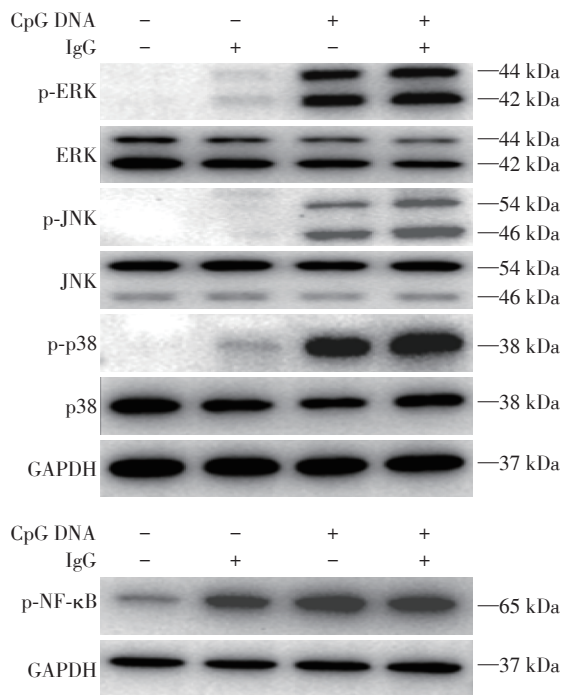
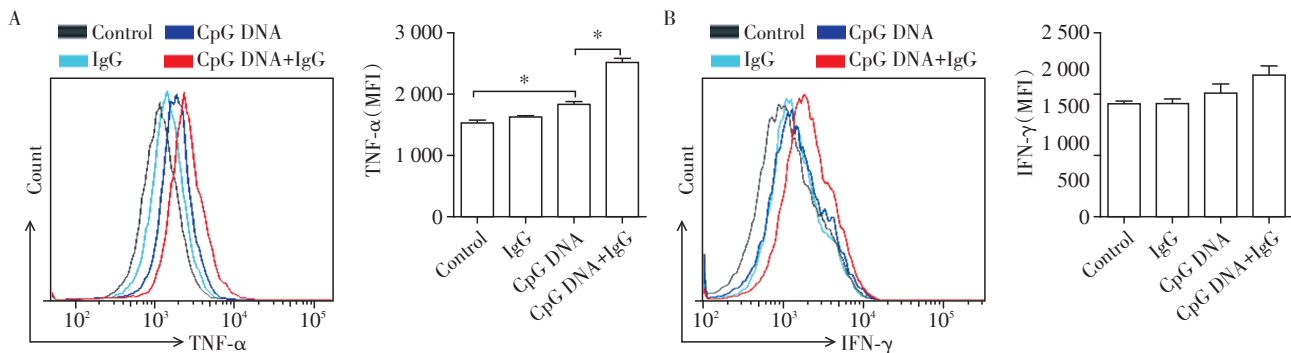


图5 IgG促进CpG DNA活化BMM JNK和p38磷酸化
Figure 5 IgG promotes JNK and p38 phosphorylation in CpG DNA-activated BMM

CpG DNA 诱导BMM分泌更多的TNF- α ,且具有统计学意义,而IFN- γ 的分泌无统计学差异,推测IgG在CpG DNA 诱导BMM活化中通过分泌大量的TNF- α ,进一步活化BMM。

3 讨论

SLE的病因是多因素的,遗传、环境等因素相互作用导致免疫细胞过度活化,产生大量自身抗体、免疫复合物及炎性细胞因子,并随血液循环到达各脏器,进而损害相应靶器官^[8]。其中,DNA低甲基化在SLE的病因学中发挥重要作用^[9]。CpG DNA包括细菌DNA和人工合成的CpG寡核苷酸序列。其中细菌DNA是富含未甲基化CpG的核苷酸序列,能够诱导体内外多种免疫学变化^[10],可能在SLE的发生发展中起了重要的作用。另外,某些合成的低甲基化CpG脱氧核苷酸也能诱导多克隆B细胞活化并产生抗DNA抗体^[11],提示某些人工合成的低甲基化CpG DNA与细菌DNA在SLE上具有相似的效应。此外,肾脏是SLE一个重要的受累器官,狼疮模型鼠体内的



**P < 0.001, n=3。

图6 IgG促进CpG DNA诱导的BMM分泌细胞因子TNF- α
Figure 6 IgG promotes BMM secreting TNF- α induced by CpG DNA

巨噬细胞清除可显著缓解其肾炎及疾病活动度^[12],提示巨噬细胞在SLE发病过程中具有重要意义。CpG DNA也可直接或间接激活免疫效应细胞如树突状细胞、B淋巴细胞和T淋巴细胞等,促进白介素(interleukin, IL)-6、IL-12等细胞因子的分泌。本实验发现CpG DNA能够活化骨髓源巨噬细胞分泌TNF- α 。

一方面抗体IgG在保护宿主不受细菌、病毒等微生物感染中很重要,且在治疗免疫性疾病如SLE中也具有一定疗效^[13-14];另一方面自身IgG抗体也是SLE自身免疫性疾病致病的主要因素^[1],如红斑狼疮

血清IgG通过TNFR1信号通路诱导皮肤炎症、抗ds-DNA的IgG沉积导致皮肤狼疮和沉积于肾小球基底膜的含IgG的免疫复合物介导的狼疮肾炎等^[15]。由于SLE患者体内部分自身抗体以IgG的形式存在^[8],这可能与凋亡细胞来源的低甲基化抗原DNA活化抗原提呈细胞表达共刺激分子释放炎症因子,继而活化自身反应性T细胞与辅助自身反应性B细胞的活化,分泌更多的自身抗体有关,从而促进狼疮疾病的发展^[16]。因此,本实验探究了自身抗体IgG与未甲基化的CpG DNA在巨噬细胞中的关系。结果表明CpG DNA对巨噬细胞表达共刺激分子CD40、

MHC II、CD80和CD86有上调作用,IgG处理后,该上调作用更加明显;CpG DNA能够诱导巨噬细胞MAPK和NF- κ B通路活化。IgG处理后,CpG DNA对巨噬细胞内p38和JNK的磷酸化有促进作用,但对CpG DNA诱导的ERK磷酸化几乎没有改变。结果也显示,IgG能够使CpG DNA诱导的巨噬细胞分泌更多的细胞因子TNF- α ,而对IFN- γ 的分泌虽有增加但无统计学意义。综上所述,本研究发现IgG在CpG DNA诱导巨噬细胞活化与JNK和p38-MAPK通路中起促进作用,通过促进上调巨噬细胞表达共刺激分子与分泌TNF- α 活化巨噬细胞。本实验结果将有助于探究自身抗体IgG与CpG DNA在SLE巨噬细胞上的相互作用,为SLE的致病机制提供新方向,从而为SLE的治疗提供新思路,如分离和消除SLE患者外周血自身抗体IgG,使其与自身抗原分离,减少免疫复合物介导的免疫炎症反应,有效预防和治疗组织器官损伤。

[参考文献]

- [1] Nagafuchi Y, Shoda H, Fujio K. Immune profiling and precision medicine in systemic lupus erythematosus [J]. *Cells*, 2019, 8(2): E140
- [2] Fang X, Zaman MH, Guo X, et al. Role of hepatic deposited immunoglobulin G in the pathogenesis of liver damage in systemic lupus erythematosus [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1457
- [3] 徐安琪,杨晓帆,王慧娟,等. 系统性红斑狼疮患者外周血T细胞CTLA-4表达及其临床意义[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(1): 62-68
- [4] Chan RW, Jiang P, Peng X, et al. Plasma DNA aberrations in systemic lupus erythematosus revealed by genomic and methylomic sequencing [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(49): E5302-E5311
- [5] Teruel M, Sawalha AH. Epigenetic variability in systemic lupus erythematosus: What we learned from genome-wide DNA methylation studies [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2017, 19(6): 32
- [6] Ohto U, Shibata T, Tanji H, et al. Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9 [J]. *Nature*, 2015, 520(7549): 702-705
- [7] Xie L, He S, Kong N, et al. CpG-ODN, a TLR9 agonist, aggravates myocardial ischemia/reperfusion injury by activation of TLR9-P38 MAPK signaling [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(4): 1389-1398
- [8] Frostegard J, Hellstrom C, Nilsson P, et al. Autoantibody profiling reveals four protein candidate autoantigens associated with systemic lupus erythematosus [J]. *Lupus*, 2018, 27(10): 1670-1678
- [9] Wang X, Lei D, Ding J, et al. A DNA-methylated sight on autoimmune inflammation network across RA, pSS, and SLE [J]. *J Immunol Res*, 2018, 2018: 4390789
- [10] Bhagirath VC, Dwivedi DJ, Liaw PC. Comparison of the proinflammatory and procoagulant properties of nuclear, mitochondrial, and bacterial DNA [J]. *Shock*, 2015, 44(3): 265-271
- [11] Kim D, Rhee JW, Kwon S, et al. Immunostimulation and anti-DNA antibody production by backbone modified CpG-DNA [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379(2): 362-367
- [12] Chalmers SA, Chitu V, Herlitz LC, et al. Macrophage depletion ameliorates nephritis induced by pathogenic antibodies [J]. *J Autoimmun*, 2015, 57(1): 42-52
- [13] Xu J, Zhang C. Human IgG Fc promotes expression, secretion and immunogenicity of enterovirus 71 VP1 protein [J]. *J Biomed Res*, 2016, 30(3): 209-216
- [14] 易亮,罗福漳,邓朝蓬,等. 利妥昔单抗克隆抗体治疗难治性重症狼疮肾炎的应用研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(8): 1102-1104
- [15] Yap DYH, Yung S, Zhang Q, et al. Serum level of proximal renal tubular epithelial cell-binding immunoglobulin G in patients with lupus nephritis [J]. *Lupus*, 2016, 25(1): 46-53
- [16] Yin C, Cai X, Wang H, et al. Pathological significance and regulatory mechanism of lymphotoxin β receptor overexpression in T cells of patients with systemic lupus erythematosus [J]. *J Biomed Res*, 2018, 32(2): 113-122

[收稿日期] 2018-08-07