

抑制性寡脱氧核苷酸对肝损伤小鼠 pSTAT4、pSTAT6 和 T-bet 表达的影响及其意义

全俊, 刘悦晖, 范学工, 李 宁

(中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008)

[摘要] **目的** 探讨抑制性寡脱氧核苷酸(suppressive oligodeoxynucleotide, Sup ODN)对刀豆蛋白 A(ConA)诱导肝损伤小鼠兔抗磷酸化信号转导和转录激动子 4 抗体(pSTAT4)、pSTAT6 和 T-bet 表达的影响及其意义。**方法** Balb/C 小鼠 40 只被随机分为 4 组, 分别为生理盐水(NS, 空白对照)组、环孢菌素 A(CsA)组(阳性对照)、Con ODN 组(对照 ODN)、Sup ODN 组(实验组)。ConA(20 mg/kg)尾静脉注射 Balb/C 小鼠造模, 造模同时分别给予 Sup ODN、Con ODN、CsA 或 NS 0.3 mL 腹腔注射, 分别于干预后 8 h 和 24 h 摘取小鼠脾脏, 提取蛋白检测 pSTAT4、pSTAT6 和 T-bet 的表达。**结果** 无论是干预后 8 h 还是 24 h, Sup ODN 组 pSTAT4 及 T-bet 蛋白的表达水平与 NS、Con ODN 及 CsA 组相比, 均显著下降(均 $P < 0.01$); 而 pSTAT6 蛋白表达水平, Sup ODN 组与 NS、Con ODN 及 CsA 组差异均无显著性(均 $P > 0.05$)。**结论** Sup ODN 可能通过抑制细胞内转录因子 pSTAT4 和 T-bet 的表达, 抑制小鼠 Th1 型免疫应答, 最终实现其对肝损伤的保护作用。

[关键词] 抑制性寡脱氧核苷酸; 刀豆蛋白 A; pSTAT4; pSTAT6; T-bet; 肝损伤

[中图分类号] R512.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2010)03-0151-04

The effect of suppressive oligodeoxynucleotide on pSTAT4, pSTAT6 and T-bet expression of concanavalin A-induced liver injury in mice

QUAN Jun, LIU Yue-hui, FAN Xue-gong, LI Ning (Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of suppressive oligodeoxynucleotide (Sup ODN) on pSTAT4, pSTAT6 and T-bet expression of concanavalin A induced liver injury in mice. **Methods** Forty Balb/C mice were randomly divided into 4 groups, normal saline group (NS, blank control group), cyclosporin A group (CsA group, positive control group), control oligodeoxynucleotide group (control ODN group), and Sup ODN group (trial group). Mice in each group were injected with ConA(20mg/kg) via the tail vein to make liver injury model. Sup ODN, Con ODN, CsA or NS was injected intraperitoneally at the same time of ConA injection. The expression of pSTAT4, pSTAT6 and T-bet in spleen at the 8th or 24th hour after intraperitoneal injection was examined by Western-blotting. **Results** pSTAT4 and T-bet in Sup ODN group were significantly lower compared with NS, Con ODN or CsA group respectively (all $P < 0.01$); pSTAT6 had no difference between Sup ODN group and other groups (all $P < 0.01$). **Conclusion** Sup ODN attained protective effect on ConA-induced mice liver injury by suppressing expression of pSTAT4 and T-bet.

[Key words] suppressive oligodeoxynucleotide; concanavalin A; pSTAT4; pSTAT6; T-bet; liver injury

[Chin Infect Control, 2010, 9(3): 151-154]

抑制性寡脱氧核苷酸(suppressive oligodeoxynucleotide, Sup ODN)是一类人工合成的具有免疫

抑制活性的寡核苷酸, 这类核苷酸序列在哺乳动物中呈高频率出现。新近研究表明^[1], Sup ODN 具有

[收稿日期] 2009-09-25

[作者简介] 全俊(1973-), 男(汉族), 湖南省沅陵市人, 副教授, 主要从事病毒性肝炎研究。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30671845) 湖南省卫生厅科研基金资助项目(B2005030) 教育部高校博士点基金新教师资助项目(20070533009)

[通讯作者] 范学工 E-mail: xgfan57@126.com

下调 Th1 型细胞因子和抑制炎症介质产生的作用。刀豆蛋白 A(ConA) 所致肝损伤机制主要由免疫反应所介导, Th1 型细胞因子及促炎症介质在其中发挥重要作用^[2-3], 此与人类重型病毒性肝炎的发病机制非常类似。我们已成功构建 ConA 所诱导肝损伤小鼠模型^[4], 并且证明 Sup ODN 对 ConA 所致肝损伤小鼠具有保护作用^[5], 本实验进一步研究了 Sup ODN 对 ConA 诱导肝损伤小鼠的保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象 雌性 Balb/C 小鼠(SPF 级), 6~8 周龄, 体重 18~22 g, 购自中南大学实验动物中心。所有动物实验均得到中南大学实验动物中心实验动物管理与使用认证协会(IACUC)批准。

1.2 主要试剂 Sup ODN 序列为 TTAGGG TTAGGG TTAGGG TTAGGG; 对照 ODN(Con ODN) 序列为 TTACCC TTACCC TTACCC TTACCC^[6], 以上 2 个 ODN 序列均由上海生工生物工程有限公司合成并纯化。主要试剂: Con A (Sigma)、环孢菌素 A (CsA, 瑞士诺华制药)、山羊抗兔 Ig-G-HRP 二抗(中国北京中杉生物有限公司)、兔抗鼠磷酸化信号转导和转录激动子 4 抗体(pSTAT4, phosphorylation signal transducers and activators of transcription 4, Invitrogen)、pSTAT 6、T-bet(T box expressed in T cells, Invitrogen)。

1.3 方法

1.3.1 Con A 肝损伤小鼠模型的制备与干预^[4] 参照文献^[7]建立 Con A 小鼠肝损伤模型。实验分 4 组, 分别为生理盐水(NS, 空白对照)组、CsA 组(阳性对照)、Con ODN 组(对照 ODN)、Sup ODN 组(实验组), 每组又分为 8 h 和 24 h 两个时间点, 每个时间点 10 只小鼠。ConA(20 mg/kg)尾静脉注射 Balb/C 小鼠造模, 造模同时分别给予 Sup ODN(20 mg/kg)、Con ODN(20 mg/kg)、CsA(130 mg/kg)或 NS 0.3 mL 腹腔注射。动物禁食, 但可以自由饮水。选择干预后 8 h 和 24 h 摘取小鼠脾脏提取蛋白检测 pSTAT4、pSTAT6 和 T-bet 的表达, 观察 Sup ODN 对 ConA 所致肝损伤小鼠信号传导分子 pSTAT4、pSTAT6 及 T-bet 表达的影响。

1.3.2 Western-blotting 检测脾脏中 pSTAT4、pSTAT6、T-bet 蛋白表达 常规提取脾脏中的蛋白质, 分别取 50 μg 总蛋白上样, 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将蛋白质电转移至硝酸纤维素膜, 5%脱脂奶

粉封闭 1 h, 分别加入一抗 pSTAT4、pSTAT6、T-bet和 β-actin(1 : 1 000)孵育, TBST 洗脱后再加入山羊抗兔 Ig-G-HRP 二抗孵育, 然后进行洗脱、显影、定影和洗片, 将胶片用凝胶图像处理系统分析目标带相对含量 = 目的蛋白条带光密度值/相应的内参照蛋白条带光密度值。

1.4 统计学分析 结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组之间比较采用 *t* 检验。以上统计处理用 SPSS 12.0 软件自动完成。

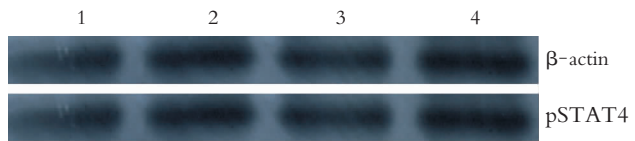
2 结果

8 h 时, NS 组、Con ODN 组、CsA 组均有 3 只小鼠死亡, Sup ODN 组无小鼠死亡。Sup ODN 组 pSTAT 4 及 T-bet 蛋白表达水平与 NS、Con ODN 及 CsA 组比较, 显著下降($P < 0.01$); 而 pSTAT 6 蛋白表达水平, Sup ODN 组与 NS、Con ODN 及 CsA 组差异无显著性($P > 0.05$), 详见表 1 和图 1~3。

表 1 8 h 时不同组别小鼠脾脏中 pSTAT4、pSTAT6、T-bet 蛋白的表达

Table 1 The expression of pSTAT4, pSTAT6 and T-bet in spleen at the 8th hour

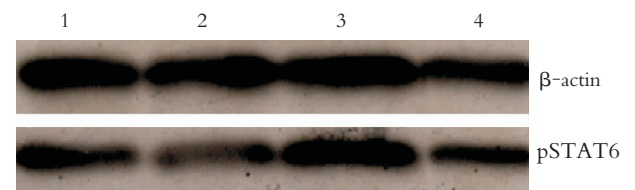
组别	<i>n</i>	pSTAT4	pSTAT6	T-bet
NS	7	0.96 ± 0.14	0.59 ± 0.08	0.71 ± 0.07
CsA	7	0.99 ± 0.20	0.60 ± 0.09	0.71 ± 0.10
Con ODN	7	0.99 ± 0.21	0.62 ± 0.08	0.68 ± 0.09
Sup ODN	10	0.44 ± 0.10	0.61 ± 0.08	0.39 ± 0.09



1: Sup ODN 组; 2: CsA 组; 3: Con ODN 组; 4: NS 组

图 1 8 h 时脾脏中 pSTAT4 表达

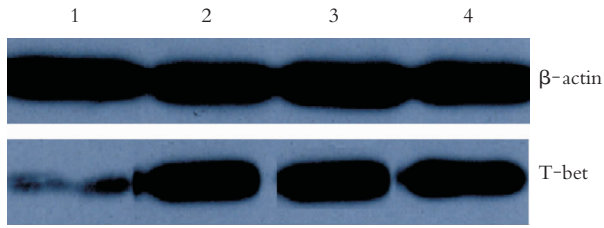
Figure 1 The expression of pSTAT4 in spleen at the 8th hour



1: Sup ODN 组; 2: CsA 组; 3: Con ODN 组; 4: NS 组

图 2 8 h 时脾脏中 pSTAT6 表达

Figure 2 The expression of pSTAT6 in spleen at the 8th hour



1: Sup ODN 组; 2: CsA 组; 3: Con ODN 组; 4: NS 组

图 3 8 h 时脾脏中 T-bet 表达

Figure 3 The expression of T-bet in spleen at the 8th hour

24 h 时, NS、Con ODN 和 CsA 组均有 3 只小鼠死亡, Sup ODN 组有 1 只小鼠死亡。Sup ODN 组 pSTAT4 和 T-bet 蛋白表达水平与 NS、Con ODN 及 CsA 组相比, 显著降低 ($P < 0.01$); 而 pSTAT6 蛋白表达水平, Sup ODN 组与 NS、Con ODN 及 CsA 组差异无显著性 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 24 h 时不同组别小鼠脾脏中 pSTAT4、pSTAT6 和 T-bet 蛋白的表达

Table 2 The expression of pSTAT4, pSTAT6 and T-bet in spleen at the 24th hour

组别	n	pSTAT4	pSTAT6	T-bet
NS	7	0.57 ± 0.10	0.54 ± 0.05	0.62 ± 0.09
CsA	7	0.65 ± 0.08	0.54 ± 0.08	0.66 ± 0.06
Con ODN	7	0.61 ± 0.12	0.52 ± 0.07	0.65 ± 0.06
Sup ODN	9	0.23 ± 0.09	0.55 ± 0.12	0.33 ± 0.79

3 讨论

Sup ODN 是一类人工合成的具有免疫抑制活性的寡核苷酸。含多聚“G”结构的 Sup ODN, 如“TTAGGG”多聚体, 具有更广泛的抑制效应, 它能降低干扰素 (IFN)- γ 的生成, 下调 Th1 型细胞因子和炎症介质的产生。基于 Sup ODN 选择性抑制 Th1 免疫应答的生物学特征, 其在医学中的应用已成为学术界关注的焦点。

研究发现^[8-9], 重型病毒性肝炎患者血清 IFN- γ 、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 和白细胞介素 (IL)-12 水平显著升高, 来源于活化 T 细胞的 IFN- γ 及 TNF- α 是导致肝脏坏死的基础^[10]。Sup ODN 能特异性地抑制 Th1 细胞的活化与分化, 提示我们可应用其来抑制重型肝炎过强的免疫反应。本研究选择与重型肝炎发病机制有相似之处的 Con A 诱导肝损伤模型为研究对象探讨 Sup ODN 对 Con A 诱导肝损伤保护作用的机制。

本研究前期已成功构建 ConA 所诱导肝损伤小鼠模型^[4], 造模同时腹腔注射 Sup ODN, 结果表明 Sup ODN 抑制 Con A 所致肝损伤小鼠 Th1 型细胞因子 IFN- γ 的产生, 上调 Th2 型细胞因子 IL-4 的表达^[5]; 磷酸化的 STAT4 和 T-bet 表达降低; 而对磷酸化的 STAT6 无影响, 对肝损伤小鼠确有保护作用, 降低小鼠死亡率。Th 细胞分化决定免疫应答的性质, 局部环境中的细胞因子以及转录因子在 Th 转化中起主要作用。细胞因子 IL-12、IL-23、IL-27、IFN 以及转录因子 T-bet、STAT4 和 IRF1 促进 Th1 细胞分化; 细胞因子 IL-4 以及转录因子 STAT6、GATA-3、IRF4、c-Maf、NFATs 促进 Th2 细胞分化, 其中尤以 IL-4 最为重要^[11-13]。我们的研究发现, 虽然 IL-4 增加了, 但没有下调与之相关的 STAT6 磷酸化。Sup ODN 通过抑制 IFN- γ 和 IL-12 信号通路中的磷酸化 STAT4 和 T-bet 表达, 阻断 CD4 + T 细胞分化成 Th1 细胞^[7]。研究发现逆转录病毒转导 T-bet 基因至 Th0、Th1 或 Th2 细胞, 均导致 IFN- γ 显著表达, 并抑制 IL-4、IL-5 生成, 因此 T-bet 是反映 Th1 细胞释放细胞因子的良好标志^[14]。IFN- γ 可诱导转录因子 T-bet 表达, T-bet 可促进 IL-12R β 2 的产生, 使 CD4 + T 细胞产生更多 IFN- γ , 形成正反馈回路^[3]。有研究表明^[15-16], IFN- γ 除受 T-bet 调节影响外还受 STAT4 的影响; 当 STAT4 缺少或缺陷时则表现 IFN- γ 的表达减少, 倾向于 Th2 型的免疫应答。研究发现从免疫 STAT4 缺陷小鼠体内分离得到的 T 细胞 IFN- γ 产生量减少, 而 Th2 细胞因子, 如 IL-4、IL-5 和 IL-10 的分泌量增加^[16]。

综上所述, Sup ODN 通过抑制细胞内转录因子 pSTAT4 和 T-bet 表达, 抑制其介导的信号通路及 Th1 细胞分化, 降低 IFN- γ 表达, 增高 Th2 细胞因子 IL-4 的表达, 从而改变 Th1 和 Th2 的比例。故我们认为 Sup ODN 是通过抑制过强 Th1 免疫反应, 从而起到保护肝损伤的作用。

IFN- γ 、TNF- α 均是重要的炎症因子, 本实验中另一个值得注意, 也是出乎我们意料的结果是, Sup ODN 显著抑制小鼠 IFN- γ 的产生和磷酸化 STAT4 及 T-bet 表达; 对 TNF- α 及磷酸化的 STAT6 表达无影响, 而 Th2 因子 IL-4 升高。CsA 主要抑制 TNF- α 的产生, 对 IFN- γ 、IL-4 的产生无影响; 对磷酸化的 STAT4、STAT6 和 T-bet 表达亦无影响。这表明 Sup ODN 和 CsA 发挥作用的途径可能不同。Sup ODN 对其他细胞因子的影响如何,

是否还有其他调节机制,这都需要进一步的研究来阐明。

[参 考 文 献]

- [1] Dennis M K, Glurse I, Klaschik S, *et al.* Therapeutic potential of oligodeoxynucleotides expressing immunosuppressive TTAGGG motifs[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1058 (1): 87 - 95.
- [2] Tagawa Y, Sekikawa K, Iwakura Y. Suppression of concanavalin A-induced hepatitis in IFN-gamma mice, but not in TNF-alpha mice; role for IFN-gamma in activating apoptosis of hepatocytes[J]. *J Immunol*, 1997, 159 (3): 1418 - 1428.
- [3] Matsumoto G, Tsunematsu S, Tsukinoki K, *et al.* Essential role of the adhesion receptor LFA-1 for T cell-dependent fulminant hepatitis[J]. *J Immunol*, 2002, 169 (12): 7087 - 7096.
- [4] 刘悦晖,范学工,李宁,等. 刀豆素 A 所致实验性肝损伤模型的构建[J]. *中国感染控制杂志*, 2008, 8(5): 297 - 301.
- [5] 刘悦晖,范学工,李宁,等. 抑制性寡脱氧核苷酸对实验性肝损伤细胞因子的影响[J]. *生命科学研究*, 2008, 12(3): 262 - 266.
- [6] Shirota H, Gursel I, Gursel M, *et al.* Suppressive oligodeoxynucleotides protect mice from lethal endotoxic shock[J]. *J Immunol*, 2005, 174(5): 4579 - 4583.
- [7] Shirota H, Gursel M, Klinman D M. Suppressive oligodeoxynucleotides inhibit Th1 differentiation by blocking IFN-gamma and IL-12-mediated signaling[J]. *J Immunol*, 2004, 173 (8): 5002 - 5007.
- [8] Nagaki M, Iwai H, Naiki T, *et al.* High levels of serum interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha are associated with fatality in fulminant hepatitis[J]. *J Infect Dis*, 2000, 182(4): 1103 - 1108.
- [9] Yumoto E, Higashi T, Nouse K, *et al.* Serum gamma-interferon-inducing factor (IL-18) and IL-10 levels in patients with acute hepatitis and fulminant hepatic failure[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002, 17(3): 285 - 294.
- [10] Ohta A, Sekimoto M, Sato M, *et al.* Indispensable role for TNF-alpha and IFN-gamma at the effector phase of liver injury mediated by Th1 cells specific to hepatitis B virus surface antigen[J]. *J Immunol*, 2000, 165(2): 956 - 961.
- [11] Agnello D, Lankford C S, Bream J, *et al.* Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation; new players and new insight[J]. *J Clin Immunol*, 2003, 23(3): 147 - 161.
- [12] Lohoff M, Mak T W. Role of interferon regulatory factors in helper cell differentiation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(2): 125 - 135.
- [13] Mendoza L. A network model for the control of the differentiation process in Th cells[J]. *Biosystems*, 2006, 84(2): 101 - 114.
- [14] Szabo S J, Sullivan B M, Stemmann C, *et al.* Distinct effects of T-bet in Th1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cell[J]. *Science*, 2002, 295 (5553): 338 - 342.
- [15] Chitnis T, Najafian N, Benou C, *et al.* Effect of targeted disruption of STAT4 and STAT6 on the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(5): 739 - 747.
- [16] Chang H C, Zhang S, Kaplan M H. Neonatal tolerance in the absence of Stat4 and Stat6-dependent Th cell differentiation [J]. *J Immunol*, 2002, 169(8): 4124 - 4128.
- [32] Milefchik E, Leal M A, Haubrich R, *et al.* Fluconazole alone or combined with flucytosine for the treatment of AIDS-associated cryptococcal meningitis [J]. *Med Mycol*, 2008, 46(4): 393 - 395.
- [33] Zhou Q, Gault R A, Kozel T R, *et al.* Protection from direct cerebral cryptococcus infection by interferon-gamma-dependent activation of microglial cells [J]. *J Immunol*, 2007, 178(9): 5753 - 5761.
- [34] Pappas P G, Bustamante B, Ticona E, *et al.* Recombinant interferon-gamma 1b as adjunctive therapy for AIDS-related acute cryptococcal meningitis [J]. *J Infect Dis*, 2004, 189(12): 2185 - 2191.
- [35] Dan J M, Levitz S M. Prospects for development of vaccines against fungal diseases [J]. *Drug Resist Updat*, 2006, 9(3): 105 - 110.
- [36] Woodworth G F, McGirt M J, Williams M A, *et al.* The use of ventriculoperitoneal shunts for uncontrollable intracranial hypertension without ventriculomegaly secondary to HIV-associated cryptococcal meningitis [J]. *Surg Neurol*, 2005, 63 (6): 529 - 531.
- [37] Newton P N, Thai le H, Tip N Q, *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of acetazolamide for the treatment of elevated intracranial pressure in cryptococcal meningitis [J]. *Clin Infect Dis*, 2002, 35(6): 769 - 772.
- [38] Sun H Y, Hung C C, Chang S C. Management of cryptococcal meningitis with extremely high intracranial pressure in HIV-infected patients [J]. *Clin Infect Dis*, 2004, 38(12): 1790 - 1792.
- [39] Satishchandra P, Mathew T, Gadre G, *et al.* Cryptococcal meningitis: clinical, diagnostic and therapeutic overviews [J]. *Neurol India*, 2007, 55(3): 226 - 232.

(上接第 150 页)