

# 具有免疫刺激活性的非甲基化寡核苷酸链的研究进展\*

郑梅珍 蒋建伟\*\*

(暨南大学医学院生化教研室, 广州 510632)

**摘要** 富含非甲基化碱基 CG 的寡核苷酸链 (CpG-oligodeoxynucleotides, CpG-ODN), 具有免疫刺激活性. 其骨架及侧翼核苷酸序列决定 CpG-ODN 免疫效应的强度及特异性. 最近研究发现, 通过对 CpG-ODN 中核苷酸上的基团进行化学修饰, 或改变侧翼核苷酸序列均能影响 CpG-ODN 的免疫活性、种属及细胞特异性. 这对 CpG-ODN 的深入研究和应用具有一定的指导价值.

**关键词** CpG-ODN, 化学修饰, 免疫刺激效应

**学科分类号** Q52

最近研究发现富含非甲基化碱基 CG 的寡核苷酸链 (CpG-ODN) 具有免疫刺激活性, 又称免疫刺激序列 (immunostimulatory sequences, ISS) 或 CpG 基序 (CpG motifs). CpG-ODN 能够刺激免疫细胞, 产生多种细胞因子和细胞表面粘附分子, 诱导细胞及体液免疫效应, 在免疫疾病治疗, 肿瘤治疗及基因疫苗等方面具有广阔的前景. 但由于 CpG-ODN 种属及细胞特异性很大, 对动物特异有效的 CpG-ODN 对人不一定有效, 所以难以开展临床实验. 最近发现通过变换 CpG-ODN 中侧翼核苷酸序列, 对核苷酸各个基团进行化学修饰, 都将影响 CpG-ODN 免疫活性及种属特异性. 提示我们可以根据这些原则设计对人及某种动物普遍有效的 CpG-ODN, 通过以该种动物为模型研究 CpG-ODN 的免疫作用, 为 CpG-ODN 在人类中的应用研究提

供素材, 为其应用于临床提供实验基础.

## 1 CpG-ODN 的基本结构及种类

通过分析具有免疫刺激效应的 CpG-ODN 发现: CpG-ODN 基本骨架为 5'-PuPuCGPyPy-3', 核心碱基 CG 非甲基化是 CpG-ODN 具有免疫刺激活性所必需, 如果碱基 CG 顺序倒转或被其他碱基替代, CpG-ODN 的免疫活性将丧失<sup>[1]</sup>.

CpG-ODN 具有两种骨架: 磷酸二酯结构 (phosphodiester, PO); 磷酸硫代结构 (phosphorothiate, PS). 另有研究发现两种不同结构的 CpG-ODN: D 型和 K 型, 对人体外周血单核细胞 (PBMCs) 产生不同的免疫效应<sup>[2]</sup>. 它们的区别见表 1.

Table 1 The comparison of D type and K type CpG-ODN

表 1 D 型 CpG-ODN 和 K 型 CpG-ODN 的比较

类型	骨架	二级结构	刺激的细胞	产生的细胞因子	3'端
D 型	末端为硫代的多聚 G 中间是 CpG 回文结构	形成	NK	IFN- $\gamma$	G
K 型	完全硫代	不能形成	B, 单核	IgM, IL-6	TpT/A

## 2 CpG-ODN 的特异性

### 2.1 种属特异性

目前对人免疫增强作用特异强效的 CpG-ODN 序列为 5' TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT 3'<sup>[3]</sup>, 代号 2006. 国内学者设计 CpG-ODN,

刺激人外周血单核细胞, 以 IgM 为指标, 发现 T8: 3' TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG 5'

\* 广东省自然科学基金资助项目 (000754).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 020-85220256, E-mail: jjw703@sohu.com

收稿日期: 2002-10-24, 接受日期: 2002-12-28

及比 T8 少一个 TCG 的 T7, 二者免疫刺激活性均强于国外报道的 CpG2006<sup>[4]</sup>, 提示 CpG-ODN 中含 CG 越多, 免疫活性越强. 原因可能是富含 CG 的 CpG-ODN 形成二级结构, 更易进入细胞, 更不易被酶降解. 另外分析发现对人有效的 CpG-ODN, 一般含有 5' GTCGTT 3', 5' GTCGTC 3' 或 5' TTCGTT 3' 刺激序列. 最近研究发现 2006 不仅对人免疫作用强, 而且对猩猩及猕猴也都有强效<sup>[5]</sup>. 说明种源越近, CpG-ODN 序列一致性越高.

2007<sup>[6]</sup> 均能促进猫和狗的免疫细胞增殖, 其序列为 5' TCG TCG TTG TCG TTT TGT CGT T 3'; 对牛最有效的是 2135<sup>[7]</sup>, 其碱基序列为 5' TCG TCG TTT GTC GTT TTG TCG TT 3'. 2135 仅仅比 2007 多一个碱基 T.

对鼠最有效的是 1826<sup>[8]</sup>, 其碱基序列为 5' TCC ATC ACG TTC CTG ACG TT 3', 对鼠有效的 CpG-ODN 一般含有 5' CACGTT 3' 或 5' GACGTT 3' 刺激序列. 与对人有效的 CpG-ODN 相比主要不同在于: 与 CpG 5' 端相邻的碱基不一样, 人的为 T, 鼠的为 A.

最近报道含序列 5' AACGTT 3' 的 5' ATC GAC TCT CGA ACG TTC TC 3' 及分别含 5' AACGTT 3' 和 5' GACGTT 3' 的 5' GCT AGA CGT TAA CGT T 3' 对鲤鱼有非特异免疫刺激活性, 前者强于后者<sup>[9]</sup>. 可见 5' GACGTT 3' 刺激序列对鼠、鱼有效, 它们与 CpG 5' 端相邻的碱基都是 A.

上述资料可见 CpG-ODN 存在种属特异性. 含 5' GTCGTT 3' 刺激序列的 CpG-ODN 对人、猩猩、猕猴、猫、狗、牛均有效, 提示我们可以以猫、狗等动物进行整体试验研究, 为 CpG-ODN 应用于临床提供素材. 许洪林等<sup>[10]</sup> 研究报道: 小鼠可作为动物模型, 用于 5' GTCGTT 3' 特征序列的人 CpG-ODN 免疫作用的研究.

## 2.2 细胞特异性

小鼠 B 细胞特异激活的序列<sup>[1]</sup> 为 5' GACGTC 3' 或 5' GACGTT 3', 5' GACGTC 3' 能较好地激活皮下树突状细胞 (DC 细胞), 产生肿瘤坏死因子 (TNF) - $\alpha$ 、干扰素 (IFN) - $\alpha$ 、白介素 (IL) -12 等细胞因子 (CK)<sup>[11]</sup>.

对 NK 细胞来说, 5' GACGTT 3', 5' AGCGCT 3', 5' AACGTT 3' 等回文结构对其有免疫活性<sup>[11]</sup>. IL-12 激活的 NK 细胞对 5' AACGTT 3' 反应最强烈; 5' GACGAT 3' 能最有效地刺激未激活的 NK 细胞产生 IFN- $\gamma$ <sup>[12]</sup>.

由于 CpG-ODN 存在种属及细胞特异性, 在筛选特异有效的 CpG-ODN 时应依据相关原则进行设计. 若欲研究 CpG-ODN 在肿瘤治疗中的作用, 应该设计对人特异有效的 CpG-ODN 序列, 且应对 NK 细胞效果较好; 要研究 CpG-ODN 作为一种新型免疫佐剂的作用情况时, 则应使设计的 CpG-ODN 对 B 细胞有较好的刺激效果.

## 3 化学修饰影响 CpG-ODN 免疫刺激活性

对 CpG-ODN 核苷酸中磷酸、碱基及糖基修饰可以影响 CpG-ODN 的免疫活性. 磷酸基团上所带的负电荷是 CpG-ODN 识别其受体的必要条件, 碱基及糖基修饰对其免疫活性也有影响.

### 3.1 CpG-ODN 骨架的化学修饰

CpG 核苷酸中磷酸基团上的羟基被甲基取代后, 呈电中性, 影响了 CpG-ODN 与受体的识别, 如被硫原子取代, 可以防止核酸酶的降解, 增强 CpG-ODN 的稳定性. 戊糖上 2'-H 被其他化学基团所取代可以抑制免疫活性, 说明 2'-H 对于受体识别有重要作用. CG 碱基本身结构的改变也可影响 CpG-ODN 的免疫活性: 胞嘧啶中的 2, 3, 4 位基团影响 CpG-ODN 与受体的结合; 5 位甲基化可导致 CpG-ODN 免疫活性消失. 若对鸟嘌呤 1, 2, 6 位进行化学修饰则 CpG-ODN 免疫活性消失. 鸟嘌呤 2, 3 位上功能基团若分别被酮基、亚氨基取代则均可使 CpG-ODN 免疫活性下降<sup>[13-15]</sup>. 可见非甲基化的核心序列 CG 是 CpG-ODN 免疫刺激效应的功能部位.

### 3.2 CpG-ODN 侧翼核苷酸的化学修饰

CpG 5' 端相邻的第 1, 2 个核苷酸对 CpG-ODN 的免疫效应至关重要, 其结构改变及碱基替代均可使 CpG-ODN 免疫活性下降甚至丧失, 且与种属的特异性密切相关. 对 CpG-ODN 两端戊糖同时进行化学修饰可增强其免疫活性, 可能是 2'-O-CH<sub>3</sub> 引起构象改变, 使 CpG-ODN 更易于与受体的识别和结合<sup>[2,15]</sup>. 这些研究提示我们在进行 CpG-ODN 设计时要保证 CpG 5' 端相邻的第 1, 2 个核苷酸结构及序列的准确性, 同时可以根据实验具体目的改变其他核苷酸.

碱基硫代可影响 CpG-ODN 的免疫活性. 全硫代能够提高 CpG-ODN 的免疫效应, 但是毒副作用大; 5' 端和 3' 端各 2 个位置硫代的部分硫代免疫作用与全硫代作用相似, 而毒性要小得多. 由于寡核苷酸主要被血清中的 3' 外切核酸酶降解, 所以未

经修饰的线性寡核苷酸降解严重, 末端部分硫代修饰的寡核苷酸稳定性明显提高; 自身互补形成的配对结构具有有效保护 3' 端的作用, 含有 4 个以上 (含 4 个) GC 对的 3' 端发夹结构的寡核苷酸, 其抗核酸酶的能力与硫代修饰的寡核苷酸相似<sup>[16]</sup>. 所以在设计 CpG-ODN 时可以进行 3' 端部分硫代, 或者在 3' 端设计发夹结构, 这样既不影响 CpG-ODN 的刺激活性, 又可以降低硫代引起的毒副作用.

### 3.3 CpG-ODN 中化学基团所带的电荷

与 CpG 5' 端相邻核苷酸中磷酸基团上的负电荷对于受体识别、相互作用及免疫效应的产生是必需的. 与 CpG 5' 端相邻的第 1 至第 3 个核苷酸中磷酸基团上 OH 被 OCH<sub>3</sub> 取代后, CpG-ODN 免疫活性受抑制; 而对 CpG 5' 端相邻的第 5 或第 6 个核苷酸进行类似的处理后, CpG-ODN 免疫效应增强<sup>[14]</sup>.

## 4 ISS 对 CpG-ODN 免疫效应的影响

施海晶等<sup>[17]</sup> 研究发现: 含 2 个刺激序列 (ISS) 的 CpG-ODN 具有较好的佐剂效应, 能增强甲型肝炎灭活疫苗的免疫效果, 含 4 个 ISS 的 CpG-ODN 不具有免疫刺激作用. 许洪林等<sup>[4]</sup> 设计含 2~6 拷贝的 CG 基序, 15~30 个碱基的 CpG-ODN, 发现富含 CG 的 21 和 24 个碱基的 T7 和 T8 具有强免疫效应, 而含 16、27 和 30 个碱基的 CpG-ODN 免疫作用弱, 提示 20 个碱基左右富含 CG 的 CpG-ODN 具有较高的免疫活性.

## 5 CpG-ODN 剂量、途径影响其免疫效应

国外研究发现 CpG-ODN 免疫作用存在剂量效应. 不同免疫途径所用 CpG-ODN 量不同: 腹腔注射及肌肉注射用量较小, 一般采用 10 μg 就具有免疫效应<sup>[18]</sup>; 口服用量较大, 需 100 μg 甚至更大的量<sup>[19]</sup>. 对于小鼠实验, 肌肉注射效果比腹腔注射效果好.

## 6 生物大分子对 CpG-ODN 的影响

脂质体及矿物油等载体可以提高 CpG-ODN 免疫效应<sup>[20]</sup>. 研究发现: CpG 5' 端的核苷酸与大分子, 如抗原、抗体等共价结合可以干扰 CpG-ODN 与受体的识别, 从而降低 CpG-ODN 的免疫活性<sup>[2]</sup>. 另一方面的试验则发现 CpG-ODN 与抗乙肝表面抗原抗体 (HBsAg)、卵血清白蛋白 (OVA)

等交联大大可提高免疫效应<sup>[21]</sup>.

胡振林等<sup>[22]</sup> 报道, 采用酵母杂交系统筛选 CpG 免疫活性系列的特异性结合蛋白, 发现 CpG-ODN 能与某些蛋白质特异性结合, 已获得 4 个双阳性克隆, 其中两个编码功能未知的蛋白质, 而另外两个均编码免疫球蛋白的轻链, 分别与抗 DNA 抗体和 HBsAb 具有高度同源性. 我们实验室亦证实, 在紫外照射下 CpG-ODN 与 HBsAg 可以交联结合.

综上所述, CpG-ODN 具有种属及细胞特异性, 非甲基化的核心序列 CG 是 CpG-ODN 免疫刺激活性所必需. 与骨架相邻的磷酸基团带负电荷才能被 CpG-ODN 受体识别, CpG 5' 端相邻的第 1 及第 2 个核苷酸对 CpG-ODN 免疫活性的产生有着极其重要的作用, 含 2 到 3 个刺激序列约 20~24 个碱基左右的 CpG-ODN 免疫效应较强, 同时 CpG-ODN 免疫作用存在剂量效应, 且与免疫途径有关. 故在寻找特异强效的 CpG-ODN 过程中要根据其特异性序列, 保证核心序列不变, 在 CpG 5' 端相邻的第 1、2 个核苷酸结构及序列也不变的基础上, 着重对 CpG 5' 端其他核苷酸进行化学修饰, 设计特异强效的 CpG-ODN 特征序列.

## 参 考 文 献

- 1 Krieg A M, Yi A K, Matson S, *et al.* CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B cell action. *Nature*, 1995, **374** (6522): 546~549
- 2 Verthelyi D. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CpG motifs. *J Immunol*, 2001, **166** (4): 2372~2377
- 3 Hartmann G, Krieg A M. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol*, 2000, **164** (3): 944~952
- 4 许洪林, 王四清, 王世峰, 等. 两种 CpG 基序能高度活化人免疫细胞. *中华微生物与免疫学杂志*, 2001, **21** (5): 471~475
- 5 Xu H L, Wang S Q, Wang S F, *et al.* *Chin J Microbiol Immunol*, 2001, **21** (5): 471~475
- 6 Hartmann G, Risini D. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune response *in vitro* and *in vivo*. *J Immunology*, 2000, **164** (4): 1617~1624
- 7 Wernette C M, Smith B F, Barksdale Z L, *et al.* CpG oligodeoxynucleotides stimulate canine and feline immune cell proliferation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2002, **84** (3): 223~236
- 8 Pontarollo R A, Rankin R, Babiuk L A, *et al.* Monocytes are required for optimum *in vitro* stimulation of bovine peripheral blood mononuclear cells by non-methylated CpG motifs. *Vet Immunol Immunopathol*, 2002, **84** (1): 43~59
- 9 Krieg A M, Yi A K, Schorr J, *et al.* The role of CpG dinucleotides in DNA vaccine. *Trends Microbiol*, 1998, **6** (1): 23~27

- 9 Rankin R, Pontarollo R, Gomis S, *et al.* CpG-containing oligodeoxynucleotides augment and switch the immune responses of cattle to bovine herpesvirus 1 glycoprotein D. *Vaccine*, 2002, **20** (23): 3014~ 3022
- 10 许洪林, 王四清, 王世峰, 等. 利用小鼠模型评价含 5-GTCGTT-3 特征序列的人 CpG 寡脱氧核苷酸免疫刺激活性. *病毒学报*, 2001, **17** (1): 43~ 47
- Xu H L, Wang S Q, Wang S F, *et al.* *Chinese Journal of Virology*, 2001, **17** (1): 43~ 47
- 11 Chu R S, Askew D, Noss E H, *et al.* CpG oligodeoxynucleotides *in vivo* regulate macrophage class II MHC antigen processing. *J Immunol*, 1999, **163** (3): 1188~ 1194
- 12 Iho S, Yamamoto T, Takahashi T, *et al.* Oligodeoxynucleotides containing palindrome sequences with internal 5'-CpG-3' act directly on human NK and activated T cell to induce INF- $\gamma$  production *in vitro*. *J Immunol*, 1999, **163** (4): 3642~ 3652
- 13 Kandimalla E R. Effect of chemical modifications of cytosine and guanine in a CpG-motif of oligonucleotides: structure-immunostimulatory activity relationships. *Bioorg Med Chem*, 2001, **9** (3): 807~ 813
- 14 Dong Yu, Kandimalla E R, Zhao Q Y, *et al.* Modulation of immunostimulatory activity of CpG oligonucleotides by site-specific deletion of nucleobases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2001, **11** (17): 2263~ 2267
- 15 Agrawal S, Kandimalla E R. Medicinal chemistry and therapeutic potential of CpG DNA. *Trends in Molecular Medicine*, 2002, **8** (3): 114~ 120
- 16 董凡, 金由辛. 寡聚脱氧核苷酸的结构与抗降解特性的研究. *中国生物化学与分子生物学报*, 1998, **14** (1): 62~ 64
- Dong F, Jin Y X. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, **14** (1): 62~ 64
- 17 施海晶, 胡云章, 胡凝珠, 等. CpG DNA 中 ISS 数量与免疫刺激效果间的关系初探. *中国免疫学杂志*, 2001, **17** (10): 531~ 533
- Shi H J, Hu Y Z, Hu N Z, *et al.* *Chinese Journal of Immunology*, 2001, **17** (10): 531~ 533
- 18 Weeratna R D, Brazolot M C, McCluskie M J, *et al.* CpG ODN can re-direct the Th bias of established Th2 immune responses in adult and young mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2001, **32** (1): 65~ 71
- 19 McCluskie M J, Weeratna R D, *et al.* CpG DNA is an effective oral adjuvant to protein antigens in mice. *Vaccine*, 2001, **19** (8): 950~ 957
- 20 Kovarik J, Bozzotti P, Love-Homan L, *et al.* CpG oligodeoxynucleotides can circumvent the Th2 polarization of neonatal responses to vaccines but fail to fully redirect Th2 responses established by neonatal priming. *J Immunol*, 1999, **162** (8): 1611~ 1617
- 21 Elen T, Takabayashi K J, Takabayashi K, Schwartz D, *et al.* Conjugation of protein to immunostimulatory DNA results in a rapid, long-lasting and potent induction of cell-mediated and humoral immunity. *Eur J Immunol*, 2000, **30** (5): 1939~ 1947
- 22 胡振林, 孙树汉, 戴建新, 等. 应用酵母单杂交系统筛选 CpG 免疫激活系列的特异性结蛋白. *第二军医大学学报*, 2001, **22** (6): 542~ 545
- Hu Z L, Sun S H, Dai J X, *et al.* *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2001, **22** (6): 542~ 545

## Progress in Unmethylated Immunostimulatory Oligodeoxynucleotides\*

ZHENG Mei-Zhen, JIANG Jian-Wei\*\*

(Department of Chemistry, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract** Unmethylated CG-rich oligodeoxynucleotides are exhibiting several immunological effects. The backbone and the flanking sequences of CpG-ODN decide the potency and specificity of its immunostimulatory effects. Chemical modifications have been systematically incorporated into CpG-ODN and the resulting modified compounds have been studied for immunostimulatory activity, the researches show that they have strong effect on species and cells' speciality, which offer the instruction for the design of CpG-ODN.

**Key words** CpG-ODN, chemical modification, immunostimulatory effect

\* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of Guangdong Province (000754).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-20-85220256, E-mail: jjw703@sohu.com

Received: October 24, 2002 Accepted: December 28, 2002