

外源质粒DNA经胃肠道途径对小鼠免疫功能的影响

刘建文, 施用晖, 乐国伟

刘建文, 施用晖, 乐国伟, 江南大学食品营养与安全研究所, 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江苏省无锡市 214036
刘建文, 男, 1977-04-28 生, 福建仙游人, 汉族, 分子营养学博士研究生, 主要从事分子营养与代谢调控研究。
国家自然科学基金资助项目, No.30270970
项目负责人: 乐国伟, 214036, 江苏省无锡市惠河路 170 号, 江南大学营养与生物技术教研室, 江南大学工业生物技术教育部重点实验室. lgw@sytu.edu.cn
电话: 0510-5869236 传真: 0510-5869236
收稿日期: 2004-07-20 接受日期: 2004-09-19

Effect of oral administration of foreign plasmid DNA on immune function in mice

Jian-Wen Liu, Yong-Hui Shi, Guo-Wei Le

Jian-Wen Liu, Yong-Hui Shi, Guo-Wei Le, Institute of Food Nutrition and Safety, Department of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, Jiangsu Province, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30270970
Correspondence to: Dr. Guo-Wei Le, Department of Nutrition and Biotechnology, Southern Yangtze University, 170 Huihe Road, Wuxi 214036, Jiangsu Province, China. lgw@sytu.edu.cn
Received: 2004-07-20 Accepted: 2004-09-19

Abstract

AIM: To investigate the effect of foreign plasmid DNA on immune function in mice through oral administration.

METHODS: After oral administration of foreign plasmid pcDNA3, thymus and spleen index, anti-sheep red blood cell (SRBC), number of antibody secreting cell (NASC) in spleen and phagocytic activity were detected. Lymphocytic transformation rate (LTR) in spleen was determined using MTT methods. Serum IgA, IgG and IgM in immune suppression mice were also examined with immunoglobulin kit.

RESULTS: Thymus and spleen index, LTR, anti-SRBC and NASC in spleen significantly increased after administration of foreign plasmid pcDNA3 (3.53 ± 0.80 vs 5.10 ± 0.47 mg/g, $P < 0.05$; 5.69 ± 0.92 vs 7.49 ± 1.18 mg/g, $P < 0.05$; 1.047 ± 0.012 vs 1.154 ± 0.016 , $P < 0.05$; 6.46 ± 0.12 vs 8.18 ± 0.29 , $P < 0.05$; 0.403 ± 0.008 vs 0.471 ± 0.007 , $P < 0.05$; respectively). Phagocytic activity also increased significantly (phagocytic index: 0.53 ± 0.017 vs 0.72 ± 0.029 , $P < 0.01$); (phagocytic ratio: 32.30 ± 1.098 vs 60.53 ± 2.022 , $P < 0.01$). The serum IgA, IgG and IgM of immune suppression mice resumed to normal level.

CONCLUSION: Foreign plasmid DNA can induce humoral and cell mediated immune in mice after administration via the gastrointestinal tract.

Liu JW, Shi YH, Le GW. Effect of oral administration of foreign plasmid DNA on immune function in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(11):2614-2617

摘要

目的: 研究外源质粒DNA经胃肠道吸收后对小鼠免疫功能的影响。

方法: 观察外源质粒 pcDNA3 对小鼠胸腺、脾脏指数, 脾脏淋巴细胞转化率, 脾脏抗体细胞生成含量, 血清溶血素水平, 巨噬细胞吞噬指数及吞噬率的影响, 并考察了外源质粒 pcDNA3 对免疫低下小鼠血清 IgA、IgG 及 IgM 的影响。

结果: 外源质粒 pcDNA3 经胃肠道摄入后能够提高胸腺指数 (3.53 ± 0.80 vs 5.10 ± 0.47 mg/g, $P < 0.05$)、脾脏指数 (5.69 ± 0.92 vs 7.49 ± 1.18 mg/g, $P < 0.05$)、脾脏淋巴细胞转化率 (1.047 ± 0.012 vs 1.154 ± 0.016 , $P < 0.05$)、脾脏抗体细胞生成含量 (0.403 ± 0.008 vs 0.471 ± 0.007 , $P < 0.05$)、血清溶血素水平 (6.46 ± 0.12 vs 8.18 ± 0.29 , $P < 0.05$)、巨噬细胞吞噬指数 (0.53 ± 0.017 vs 0.72 ± 0.029 , $P < 0.01$) 及吞噬率 (32.30 ± 1.098 vs 60.53 ± 2.022 , $P < 0.01$), 并且能够恢复免疫低下小鼠血清 IgA、IgG 及 IgM 的水平。

结论: 外源质粒DNA经胃肠道途径摄入后能够诱导小鼠广泛的体液免疫和细胞免疫应答。

刘建文, 施用晖, 乐国伟. 外源质粒 DNA 经胃肠道途径对小鼠免疫功能的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12(11):2614-2617

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2614.asp>

0 引言

长期以来人们一直把 DNA 作为一种遗传物质, 将其与免疫活性联系起来只是近 20 年的事情. 细菌 DNA 不仅可以诱发抗体, 还能调节小鼠 B 细胞和 T 细胞的功能, 并刺激巨噬细胞产生细胞因子, 增强机体天然免疫^[1]. 外源质粒 pcDNA3 作为 DNA 疫苗的典型载体, 其质粒骨架上含有非甲基化的 CpG 序列, 非甲基化的 CpG 序列具有免疫刺激作用, 能够促进多种免疫细胞活化, 诱导细胞因子的产生, 使机体产生快速高水平的抗体应答及细胞免疫应答^[2-14]. 外源质粒 DNA 进入肠道后直接激活肠道抗原递呈细胞特异性递呈抗原到 T 和 B 淋巴细胞上, 诱导抗原特异性免疫应答. 一部分外源质粒 DNA 可以穿透肠黏膜被组织中的免疫细胞所识别并激活免疫应答. 我们口服给药, 研究外源质粒 DNA 通过肠黏膜吸收对机体产生免疫应答的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 昆明种小鼠, δ , 体质量 20 ± 2 g, 由江

苏省实验动物中心提供. 质粒 pcDNA3 与含有 pcDNA3 的大肠杆菌 DH5 α 由本室保存. 大量摇瓶发酵 5 L 含有 pcDNA3 的 *E.coli* DH5 α , 碱裂解法提取, 聚乙二醇纯化, Triton X-114 去除内毒素, 检测质粒样品 260/280>1.8, 同时进行 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳确保 DNA 的完整性并无 RNA^[15]. RPMI1640 培养基、小牛血清、MTT、谷氨酰胺和 ConA 均购自上海华美生物工程公司, 绵羊红细胞(SRBC)购自无锡市汇生试剂有限公司, 豚鼠血清自制. 其他试剂均为国产分析纯.

1.2 方法 健康昆明种小鼠 40 只, δ , 随机分成 4 组, 1 组 pcDNA3 溶液 1 g/L, 200 μ L; 2 组 pcDNA3 溶液 0.1 g/L, 200 μ L; 3 组 calf thymus DNA 1 g/L, 200 μ L; 4 组生理盐水溶液 200 μ L. DNA 样品临用前用生理盐水溶液溶解.

1.2.1 实验 1 前 3 d 连续给小鼠灌胃 3 d, 实验 10 d 眼球采血处死. 称取体质量, 无菌取脾脏、胸腺, 称质量, 分别计算脏器指数 = 脏器质量(g)/体质量(g). (1)脾脏淋巴细胞转化率(SI)测定采用 MTT 比色法^[16]. 无菌分离小鼠脾脏, 放在盛有 PBS 液的培养皿中, 按常规方法分离脾脏淋巴细胞, 最后将细胞重悬于 RPMI1640 完全培养基中, 并将细胞浓度调成 2×10^6 /L. 在 96 孔板中加入细胞悬液 200 μ L, 每个样品设 3 个阳性孔, 3 个阴性对照孔, 阳性孔中加入 10 mg/L 的 ConA, 对照孔不加 ConA. 在 37 $^{\circ}$ C, 5 mg/L CO₂ 的培养箱中培养 72 h, 结束培养前 4 h, 每孔吸弃上清 100 μ L, 加入 5 g/L 的 MTT 10 μ L, 继续培养至结束. 测定前每孔加入 DMSO 150 μ L 溶解甲紫沉淀, 于酶联免疫检测仪上 570 nm 处测定吸光度. 淋巴细胞转化率(SI) = A 阳性/A 阴性. (2)小鼠 PM Φ 吞噬实验 小鼠 ip 无菌 PBS 2 mL, 轻揉腹部 3~5 min 后, 用注射器抽取腹腔液少许, 滴加于干净载玻片上, 每片 2~3 滴. 将玻片放于平皿中, 盖好皿盖, 置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 使巨噬细胞贴壁. 取出玻片, 用生理盐水轻轻洗去未贴壁细胞. 每张玻片加酵母悬液 2 滴, 将玻片置平皿内, 于 37 $^{\circ}$ C 培养 30~40 min. 取出玻片, 用生理盐水轻轻洗去未被吞噬的酵母菌. 用 10 g/L 戊二醛固定 2~3 min, 再用生理盐水冲洗、风干, 用美蓝染色液染色 1~2 min, 冲洗, 待干. 油镜观察巨噬细胞吞噬酵母菌的现象. 统计 100 个巨噬细胞中有多少个吞噬了酵母菌, 将吞噬酵母菌的巨噬细胞数除以 100, 即为吞噬率. 再统计 100 个巨噬细胞中一共吞噬了多少个酵母菌, 将被吞噬的酵母菌总数除以 100, 得出每个巨噬细胞吞噬酵母菌的平均数, 即为吞噬指数^[17].

1.2.2 实验 2 前 3 d 连续给小鼠灌胃 3 d, 实验 6 d 所有小鼠均 ip 100 mL/L 绵羊红细胞 0.2 mL (约 4 亿个), 10 d 摘眼球取血, 37 $^{\circ}$ C 水浴使血液凝固, 2 000 r/min 离心 10 min 分离血清, 无菌分离脾脏. (1)抗体生成细胞含量(number of antibody secreting cell, NASC) SRBC 定量溶血分光光度测定法. 取脾细胞密度为 5×10^6 /L 的悬液, 2 g/L SRBC 和 100 mL/L 豚鼠血清补体各 0.5 mL, 混匀

后于 37 $^{\circ}$ C 的水浴锅中保温 1 h. 然后 3 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清. 另设不加补体的细胞悬液作为空白, 处理方法同上. 于 413 nm 处以空白调零, 测定上清的吸光值. 以吸光度表示抗体生成细胞含量. (2)血清中抗 SRBC 特异性抗体(溶血素)测定, 参照文献^[18]. 取经生理盐水稀释的小鼠血清样品 50 μ L (稀释 20 倍), 加入 0.5 mL, 50 mL/L 绵羊红细胞置于冰水浴中冷却, 并于每管中加入补体 1 mL (以 PBS 按 1:10 稀释的豚鼠血清, 自制), 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 30 min. 冰水浴中止反应. 1 500 r/min 离心 5 min, 取上清 1 mL, 加入都氏试剂 3 mL, 置于试管内充分摇匀, 放置 10 min 后, 由于溶血产生的全部血红蛋白变成氰化血红蛋白, 呈稳定的红色, 于 540 nm 测定吸光度. 以生理盐水 1 mL 代替血清样品作为样品空白. 取 0.25 mL 试验用的, 经过洗涤和稀释的 SRBC, 用都氏试剂稀释至 4 mL, 摇匀, 放置 10 min, 540 nm 比色, 该值即为试验中所用 SRBC 半数溶血时的吸光度值. 样品 HC₅₀ = (样品 A 值/SRBC 半数溶血时 A 值) \times 稀释倍数.

1.2.3 健康昆明种小鼠 40 只, δ , 随机分成 4 组, 1 组实验前 1 d 预先注射环磷酰胺(150 mg/kg)1 次, 实验前 3 d 分别每天给小鼠灌胃 pcDNA3 溶液(1 g/L)200 μ L/次; 2 组实验前 1 d 预先注射环磷酰胺(150 mg/kg)1 次, 实验前 3 d 分别每天给小鼠灌胃 pcDNA3 溶液(0.1 g/L)200 μ L/次; 3 组实验前 1 d 预先注射环磷酰胺(150 mg/kg)1 次, 实验前 3 d 分别每天给小鼠灌胃生理盐水溶液 200 μ L/次; 4 组实验前 1 d 预先注射生理盐水溶液 1 次, 实验前 3 d 分别每天给小鼠灌胃生理盐水溶液 200 μ L/次; 实验 10 d 眼球采血分离血清. 小鼠血清 IgA、IgG、IgM 等 3 种免疫球蛋白水平的测定, 11 pcDNA3(1 g/L, 200 μ L) + 环磷酰胺(150 mg/kg); 2 pcDNA3(0.1 g/L, 200 μ L) + 环磷酰胺(150 mg/kg); 3 环磷酰胺(150 mg/kg); 4 Saline Solution. 免疫球蛋白 IgA、IgG、IgM 水平测定采用温州医学院免疫球蛋白试剂盒.

统计学处理 结果采用 SPSS 软件进行方差分析.

2 结果

2.1 小鼠脏器指数及脾淋巴细胞转化率 添加质粒 pcDNA3 能够提高小鼠的胸腺指数和脾脏指数, 其中灌胃 0.1 g/L pcDNA3 组的小鼠胸腺指数和脾脏指数均显著增加($P < 0.05$, 表 1), 小牛胸腺 DNA 组小鼠的胸腺指数也略有增加, 但差异不显著. 灌胃质粒 pcDNA3 溶液的脾淋巴细胞转化率均高于对照组与小牛胸腺 DNA 组($P < 0.05$). 临床上通常用淋巴细胞的转化率来评价机体的免疫状况. 结果表明灌胃外源质粒 pcDNA3 溶液可显著($P < 0.05$)提高小鼠脾淋巴细胞的转化率, 促进淋巴细胞的转化, 是脾淋巴细胞的丝裂原.

2.2 腹腔巨噬细胞吞噬功能 灌胃质粒 pcDNA3 溶液的两组小鼠的腹腔巨噬细胞吞噬率及吞噬指数均显著高于对照组($P < 0.01$, 表 1), 显微镜下观察 1 组和 2 组 PM Φ

表1 外源质粒 pcDNA3 对小鼠脏器指数、脾淋巴细胞转化率及腹腔巨噬细胞的影响

分组	Thymus (mg/g)	Spleen (mg/g)	脾淋巴细胞转化率(SI)	吞噬率	吞噬指数
pcDNA3 1 g/L	3.81 ± 0.19	5.77 ± 0.78	1.261 ± 0.004 ^a	64.28 ± 3.207 ^{bd}	0.84 ± 0.032 ^{bd}
pcDNA3 0.1 g/L	5.10 ± 0.47 ^a	7.49 ± 1.18 ^a	1.154 ± 0.016 ^a	60.53 ± 2.022 ^{bd}	0.72 ± 0.029 ^{bd}
Calf thymus DNA 1 g/L	4.18 ± 0.29 ^a	5.46 ± 0.59	1.067 ± 0.009	34.68 ± 1.031	0.58 ± 0.016
4. Normal Saline	3.53 ± 0.80	5.69 ± 0.92	1.047 ± 0.012	32.30 ± 1.098	0.53 ± 0.017

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs Normal Saline; ^d*P*<0.01 vs Calf thymus DNA.

体积明显增大,表面突起而伸展.这表明通过胃肠道途径灌胃质粒 pcDNA3 溶液,可激活 PM Φ ,促进 PM 的吞噬功能,从而提高机体的免疫功能.而第3组小牛胸腺 DNA 与对照组相比则差异不显著,提示小牛胸腺 DNA 为真核 DNA,真核 DNA 上的 CpG 基序主要以甲基化形式存在,无免疫刺激活性.

2.3 抗体生成细胞含量、溶血素及免疫球蛋白 灌胃 pcDNA3 质粒组的抗体生成细胞数量及溶血素水平均有升高的趋势,其中灌胃 0.1 g/L pcDNA3 质粒组的血清溶血素水平明显高于对照组 (*P*<0.05,表2),而小牛胸腺 DNA 组与对照组相比,抗体生成细胞数量和溶血素水平均无增加的趋势(表2).注射环磷酰胺小鼠血清免疫球蛋白水平明显低于正常对照组 (*P*<0.05,表3),灌胃质粒 pcDNA3 溶液后,小鼠血清 IgA、IgG 及 IgM 水平均高于免疫低下组 (*P*<0.05,表3),且 1 g/L pcDNA3 组的三种免疫球蛋白水平均恢复到正常水平,说明外源质粒 DNA 具有拮抗环磷酰胺致免疫低下的作用.

2.4 免疫球蛋白

表2 外源质粒 pDNA3 对抗体生成细胞数量与溶血素水平的影响

分组	NASC	Anti-SRBC
pcDNA3 1 g/L	0.431 ± 0.002	6.59 ± 0.11
pcDNA30.1 g/L	0.471 ± 0.007 ^a	8.18 ± 0.29 ^a
Calf thymus DNA 1 g/L	0.407 ± 0.004	5.52 ± 0.12
Normal Saline	0.403 ± 0.008	6.46 ± 0.12

^a*P*<0.05 vs Normal Saline.

表3 外源质粒 pDNA3 对环磷酰胺致免疫低下小鼠血清 IgA、IgG 及 IgM 水平的影响

分组	IgA(g/L)	IgG(g/L)	IgM(g/L)
1 g/L, pcDNA3+ 环磷酰胺	1.29 ± 0.12 ^a	13.01 ± 3.42 ^a	1.17 ± 0.29 ^a
0.1 g/L, pcDNA3+ 环磷酰胺	0.77 ± 0.11	10.12 ± 2.16 ^a	1.04 ± 0.25 ^a
环磷酰胺	0.69 ± 0.16 ^c	7.74 ± 1.13 ^c	0.88 ± 0.08 ^c
Normal Saline	1.16 ± 0.45	12.11 ± 3.61	1.07 ± 0.62

^a*P*<0.05 vs 环磷酰胺; ^c*P*<0.05 vs Normal Saline.

3 讨论

细菌 DNA 本身就是一种免疫佐剂,可有效地激活多种

免疫效应细胞,并刺激其分泌活性因子.介导这一作用的是一类短核苷酸序列,称为 ISS.这些序列绝大部分是由非甲基化的胞嘧啶核苷酸和鸟嘌呤核苷酸(CpG)为基序(motif)的寡聚体构成,故又称 CpG DNA. CpG DNA 可促进在体内建立 Th1 型占优势的免疫应答,诱导 IL-12, IFN- γ 等细胞因子的产生^[19-22]. 5' -AACGTT-3' 是一种具有较强活性的 ISS,在氨苄青霉素抗性基因(ampR)中含有他的两个拷贝. Johansson *et al*^[23]发现注射质粒 pcDNA3 能够诱导细胞因子 IFN- α 的释放, pcDNA3 作为一种 DNA 疫苗载体,本身具有免疫刺激活性,其免疫刺激活性与 pcDNA3 载体上的非甲基化的 CpG 基序有关.与正常组小鼠相比,给小鼠灌注 pcDNA3,小鼠胸腺指数、脾脏指数、脾脏淋巴细胞转化率、腹腔巨噬细胞吞噬功能、脾脏抗体形成细胞数量、血清中抗 SRBC 特异性抗体水平均有所升高;而灌注小牛胸腺 DNA 组小鼠体增重、脾脏指数、血清中抗 SRBC 是特异性抗体水平等与对照组相比差异不显著.值得关注的是灌注低剂量 pcDNA3 组小鼠胸腺指数、脾脏指数、抗体生成细胞数及血清溶血素水平均较其他组高,差异显著 (*P*<0.05).灌胃 0.1 g/L 质粒 pcDNA3 对小鼠产生的免疫应答显著高于灌胃 1 g/L 质粒实验组.高剂量灌胃给药可能引起小鼠产生免疫耐受,从而使免疫应答水平反而比低剂量低.提示外源质粒 DNA 的免疫刺激作用具有一定的剂量依赖性.实验还发现质粒 DNA 对环磷酰胺致免疫低下小鼠的免疫功能具有恢复作用.

我们发现小牛胸腺 DNA(甲基化 DNA)经胃肠道途径吸收对小鼠基本上无免疫刺激作用.提示对小鼠免疫系统产生刺激作用的是非甲基化 DNA(如细菌 DNA、细菌质粒等),而甲基化 DNA(如脊椎动物 DNA)则无此作用. Johansson *et al*^[23]也发现将 pcDNA3 上的 CpG 基序甲基化后,则失去免疫刺激活性.一般认为细菌 DNA 具有免疫刺激活性是因为细菌基因组中含有大量的非甲基化的 CpG motif,而脊椎动物基因组中 CpG motif 的含量较少,仅为细菌的 1/4,且 80% 以上为甲基化修饰,因此不具有免疫刺激活性.研究发现 CpG motif 中 dC 的第 5 位碳原子是否发生甲基化对其活性的影响非常重要,将人工合成的 CpG-ODN 进行甲基化处理后,免疫活性消失,说明非甲基化的 CpG motif 是引起机体免疫应答的关键因素.但对于哺乳动物来源的 DNA,即使将其

去甲基化处理依然不能引起机体免疫应答。

以往的研究中表明外源质粒 DNA 经胃肠道摄入后, 能够在肠道中不完全降解, 以碎片的形式广泛分布于全身各个组织中^[24-25]。外源 DNA 经胃肠道吸收代谢及其对机体产生的影响并未引起人们的高度关注, 主要原因在于人们往往认为外源 DNA (包括食品中的 DNA) 大部分在肠道中被降解, 作为核酸疫苗用 DNA 则主要采取肌肉注射或基因枪方式, 口服递呈抗原往往效价太低, 一直不被人们所重视。Shimosato *et al*^[26]发现肠道中存在 TLR-9 (Toll-like receptor-9) 受体。CpG-ODN 刺激免疫细胞的作用机制主要是通过 TLR9 受体发挥作用的。TLR9 主要表达于 DC 细胞、B 细胞、NK 细胞、T 细胞等, 可以识别 CpG-ODN 并与之结合, 激发细胞氧化还原平衡的改变, 通过 MyD-88, IRAK, TRAF-8 诱发细胞信号通路包括 MAPK 和 NF- κ B, 引起细胞活化, 启动固有性免疫应答^[27-34]。

4 参考文献

- Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002;20:709-760
- Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol* 2004;4:249-258
- Klinman DM. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immunoprotective agents. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:937-946
- Ishii KJ, Gursel I, Gursel M, Klinman DM. Immunotherapeutic utility of stimulatory and suppressive oligodeoxynucleotides. *Curr Opin Mol Ther* 2004;6:166-174
- Deng JC, Moore TA, Newstead MW, Zeng X, Krieg AM, Standiford TJ. CpG oligodeoxynucleotides stimulate protective innate immunity against pulmonary *Klebsiella* infection. *J Immunol* 2004;173:5148-5155
- Mutwiri G, Pontarollo R, Babiuk S, Griebel P, van Drunen Littel-van den Hurk S, Mena A, Tsang C, Alcon V, Nichani A, Ioannou X, Gomis S, Townsend H, Hecker R, Potter A, Babiuk LA. Biological activity of immunostimulatory CpG DNA motifs in domestic animals. *Vet Immunol Immunopathol* 2003;91:89-103
- He H, Crippen TL, Farnell MB, Kogut MH. Identification of CpG oligodeoxynucleotide motifs that stimulate nitric oxide and cytokine production in avian macrophage and peripheral blood mononuclear cells. *Dev Comp Immunol* 2003;27:621-627
- Gursel M, Verthelyi D, Gursel I, Ishii KJ, Klinman DM. Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide. *J Leukoc Biol* 2002;71:813-820
- Dalpk AH, Zimmermann S, Albrecht I, Heeg K. Phosphodiester CpG oligonucleotides as adjuvants: polyguanosine runs enhance cellular uptake and improve immunostimulative activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in vitro and in vivo. *Immunology* 2002;106:102-112
- Klinman DM, Currie D. Hierarchical recognition of CpG motifs expressed by immunostimulatory oligodeoxynucleotides. *Clin Exp Immunol* 2003;133:227-232
- Gursel M, Verthelyi D, Klinman DM. CpG oligodeoxynucleotides induce human monocytes to mature into functional dendritic cells. *Eur J Immunol* 2002;32:2617-2622
- Kato A, Ogasawara T, Homma T, Batchelor J, Imai S, Wakiguchi H, Saito H, Matsumoto K. CpG oligodeoxynucleotides directly induce CXCR3 chemokines in human B cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:1139-1147
- Zhu LX, Liu J, Ye Y, Xie YH, Kong YY, Li GD, Wang Y. A candidate DNA vaccine elicits HCV specific humoral and cellular immune responses. *World J Gastroenterol* 2004;10:2488-2492
- Mena A, Nichani AK, Popowich Y, Godson DL, Dent D, Townsend HG, Mutwiri GK, Hecker R, Babiuk LA, Griebel P. Innate immune responses induced by CpG oligodeoxynucleotide stimulation of ovine blood mononuclear cells. *Immunology* 2003;110:250-257
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001:32-36
- Fujimaki H, Nohara K, Kobayashi T, Suzuki K, Eguchi-Kasai K, Tsukumo S, Kijima M, Tohyama C. Effect of a single oral dose of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on immune function in male NC/Nga mice. *Toxicol Sci* 2002;66:117-124
- 韩春卉, 李业鹏, 李燕俊, 李玉伟, 江涛, 赵熙, 钟凯, 张靖, 陈庭君, 计融. 乙醇对小鼠免疫系统影响的研究. *中国食品卫生杂志* 2004;16:221-223
- 吴克明, 曾婧, 曾南. 清宫止血颗粒对免疫低下小鼠免疫功能的影响. *中西医结合学报* 2004;2:203-205
- Jiao X, Wang RY, Qiu Q, Alter HJ, Shih JW. Enhanced hepatitis C virus NS3 specific Th1 immune responses induced by co-delivery of protein antigen and CpG with cationic liposomes. *J Gen Virol* 2004;85:1545-1553
- Lin L, Gerth AJ, Peng SL. CpG DNA redirects class-switching towards "Th1-like" Ig isotype production via TLR9 and MyD88. *Eur J Immunol* 2004;34:1483-1487
- Yi AK, Yoon JG, Yeo SJ, Hong SC, English BK, Krieg AM. Role of mitogen-activated protein kinases in CpG DNA-mediated IL-10 and IL-12 Production: central role of extracellular signal-regulated kinase in the negative feedback loop of the CpG DNA-Mediated Th1 Response. *J Immunol* 2002;168:4711-4720
- Klinman DM, Currie D, Gursel I, Verthelyi D. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol Rev* 2004;199:201-216
- Johansson E, Wallgren P, Fuxler L. The DNA vaccine vector pcDNA3 induces IFN- α production in pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;87:29-40
- 刘建文, 施用晖, 乐国伟, 方希修. 外源质粒 DNA 经小鼠胃肠道的吸收代谢动力学. *世界华人消化杂志* 2004;12:1108-1113
- Palka-Santini M, Schwarz-Herzke B, Hosel M, Renz D, Auerochs S, Brondke H, Doerfler W. The gastrointestinal tract as the portal of entry for foreign macromolecules: fate of DNA and proteins. *Mol Genet Genomics* 2003;270:201-215
- Shimosato T, Kitazawa H, Katoh S. Swine Toll-like receptor 9 (1) recognizes CpG motifs of human cell stimulant. *Biochim Biophys Acta* 2003;1627: 56-61
- He B, Qiao X, Cerutti A. CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10. *J Immunol* 2004;173:4479-4491
- Vollmer J, Weeratna RD, Jurk M, Samulowitz U, McCluskie MJ, Payette P, Davis HL, Schetter C, Krieg AM. Oligodeoxynucleotides lacking CpG dinucleotides mediate Toll-like receptor 9 dependent T helper type 2 biased immune stimulation. *Immunology* 2004;113:212-223
- Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 2004;173:3916-3924
- Amcheslavsky A, Zou W, Bar-Shavit Z. Toll-like receptor 9 regulates TNF- α expression by different mechanisms: Implications for osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2004 [Epub ahead of print]
- Takeshita F, Gursel I, Ishii KJ, Suzuki K, Gursel M, Klinman DM. Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9. *Semin Immunol* 2004;16:17-22
- Ashkar AA, Rosenthal KL. Toll-like receptor 9, CpG DNA and innate immunity. *Curr Mol Med* 2002;2:545-556
- Sivori S, Falco M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Vitale M, Moretta L. Moretta CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: Induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:10116-10121
- Li Y, Ishii K, Hiseada H, Hamano S, Zhang M, Nakanishi K, Yoshimoto T, Hemmi H, Takeda K, Akira S, Iwakura Y, Himeno K. IL-18 gene therapy develops Th1-type immune responses in Leishmania major-infected BALB/c mice: is the effect mediated by the CpG signaling TLR9? *Gene Ther* 2004;11:941-948