

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (5) :543 - 550; 4 May 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140405

微生物未甲基化 CpG DNA 对动物肠道的免疫调节作用

高侃, 刘丽, 汪海峰*

浙江农林大学动物科技学院, 浙江 临安 311300

摘要: 微生物未甲基化 CpG DNA 为富含未甲基化胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸的 DNA 片段, 能够被动物肠道细胞 Toll 样受体家族中的 TLR9 受体 (Toll-like receptor 9, TLR9) 特异性识别。未甲基化 CpG DNA 作为一种动物肠道免疫刺激因子, 不仅能够直接调节肠道固有免疫应答, 同时还能间接介导肠道适应性免疫应答。未甲基化 CpG DNA 具有调节机体免疫应答作用的应用前景, 成为免疫佐剂开发的研究热点。本文主要综述微生物未甲基化 CpG DNA 基本概念、受体 TLR9 的特征、调节动物肠道免疫作用及其信号机制, 同时阐述了未甲基化 CpG DNA 作为免疫佐剂在实际中的应用, 最后对微生物未甲基化 CpG DNA 研究与开发利用前景进行了展望。

关键词: 肠道, 微生物, 未甲基化 CpG DNA, 受体 TLR9, 免疫调节

中图分类号: R392 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 05-0543-08

微生物在初生动物肠道中定植逐步形成不同微生物区系, 成年动物肠道中含有 500 多种不同种类细菌菌群。共生微生物粘附在动物肠道表面形成微生物屏障, 抵御病原微生物的侵袭, 介导肠道免疫应答, 维持动物肠道稳态^[1]。微生物通过微生物相关分子模式 (Microorganism-associated molecular patterns, MAMPs) 与肠道细胞生物膜表面的模式识别受体 (Pattern recognition receptors, PRRs) 结合激活下游级联反应, 介导肠道免疫反应。微生物及其成分与肠道免疫细胞、上皮细胞的相互作用机制是目前肠道粘膜免疫的研究热点。研究报道表明, 微生物成分包括脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS)、磷壁酸 (Teichoic acid, TA)、肽聚糖 (Peptidoglycan, PGN) 等微生物成分在动物肠道中发挥免疫调节作用, 微生物中含有未甲基化胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸

(Cytosine-guanine, CpG) 的 DNA 片段同样也能被机体免疫系统所识别, 并介导动物肠道粘膜免疫^[2-3]。目前国内外最新研究表明, 未甲基化 CpG DNA 作为一种潜在的免疫刺激因子, 能够激活动物免疫系统并增强机体免疫应答能力, 因此成为国内外免疫佐剂开发利用研究热点。本文综述了未甲基化 CpG DNA 的基本概念、受体 TLR9 的特征、调节动物肠道免疫作用及其信号机制, 同时阐述了未甲基化 CpG DNA 作为免疫佐剂在实际中的应用, 并对微生物未甲基化 CpG DNA 研究与开发利用前景进行了展望。

1 未甲基化 CpG DNA

微生物内未甲基化的 CpG DNA 具有免疫刺激作用, 能够直接或间接激活肠道免疫系统, 增强肠道

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31172221); 浙江省自然科学基金项目 (Y14C170018); 国家科技支撑计划课题 (2012BAD39B01)

* 通信作者。E-mail: wanghaifengzj@sohu.com

作者简介: 高侃 (1989 -), 男, 浙江湖州人, 硕士研究生, 研究方向为消化道微生物与粘膜免疫。E-mail: kevingogh911@hotmail.com

收稿日期: 2014-08-16; **修回日期:** 2014-12-01

免疫应答,从而维持肠道稳态。菌体 DNA 对哺乳动物免疫系统是否具有免疫刺激作用,取决于菌体 DNA 中未甲基化 CpG 二核苷酸的含量。哺乳动物 DNA 中多为甲基化 CpG 二核苷酸,所以哺乳动物 DNA 不具备免疫刺激效应^[4]。动物肠道微生物菌群构成随动物生理状态(如年龄、健康状况等)不同而产生差异。不同肠道微生物菌群未甲基化 CpG DNA 对动物肠道免疫调节效果也不同。据报道,动物肠道中的肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、干酪乳酸

杆菌(*Lactobacillus casei*)、植物乳酸杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、鼠李糖乳酸杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)、双歧杆菌(*Bifidobacteria*)、变形菌(*Proteobacteria*)、拟杆菌(*Bacteroidetes*)等细菌富含未甲基化 CpG 二核苷酸的 DNA 片段(表 1),未甲基化 CpG 基序与肠道细胞特异性受体相互作用,调控动物肠道粘膜免疫功能,维持肠道免疫系统功能平衡^[5]。

表 1. 不同菌株 CpG 基序比较^[5]

Table 1. CpG motif content in different strains^[5]

| Strains | GC/% | Mb | CpG motif/genome | CpG motif frequency/Mb |
|--|------|-----|------------------|------------------------|
| <i>Enterococcus faecalis</i> V583 | 37 | 3.2 | 225216 | 70380 |
| <i>Lactobacillus casei</i> BL23 | 46 | 3.1 | 346378 | 111735 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 | 44 | 3.4 | 366552 | 108127 |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG | 47 | 3.0 | 360288 | 119697 |
| <i>Bifidobacterialongum</i> ATCC 15697 | 59 | 2.8 | 604886 | 216031 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 | 67 | 6.3 | 1526246 | 243809 |
| <i>Parabacteroidesdistasonis</i> ATCC 8503 | 45 | 4.8 | 581492 | 120892 |

人工合成的单链未甲基化 CpG 脱氧核糖寡核苷酸(Oligodeoxynucleotides, ODNs)能够模拟微生物菌体未甲基化 CpG DNA 的免疫刺激效应。根据特定序列组成和免疫功能,人工合成的 CpG-ODN 可被分为三大类,即 A 类、B 类和 C 类,根据不同体外试验需要,用于替代菌体未甲基化 CpG DNA。A 类 CpG-ODN 主要由嵌合的硫代磷酸和磷酸二酯骨架构成,3'端或 5'端含有至少一个未甲基化 CpG 二核苷酸的多聚鸟嘌呤回文结构,主要用于刺激树突细胞产生干扰素(Interferon, IFN)从而激活自然杀伤细胞(Natural killer cells, NK);B 类 CpG-ODN 主要由硫代磷酸骨架构成,多个未甲基化 CpG 基序存在于骨架之间,主要用于刺激 B 细胞的增殖分化;而 C 类 CpG-ODN 的 5'端具有六聚未甲基化 CpG 基序,3'端具有富含 GC 回文序列结构,功能上同时具备 A 类和 B 类 ODN 的特点^[6]。

2 未甲基化 CpG DNA 受体

微生物 MAMP 通过与机体肠道细胞表面的 PRR 结合,发挥调节效应。Toll 样受体家族(Toll-like receptors, TLRs)是一类存在于动物肠道细胞生物膜表面的 I 类跨膜蛋白,通过特异性识别并结合

相对应微生物 MAMP,引起机体细胞免疫应答,在介导机体肠道固有免疫中发挥着重要的作用^[7]。研究报告已有 10 种特异性配体的 TLR,如 TLR2、TLR4、TLR5 和 TLR9 分别能够特异性识别并结合磷壁酸 LTA、脂多糖 LPS、鞭毛和未甲基化 CpG DNA 等。本课题组先前已经对 Toll 样受体介导的肠道免疫调节相关研究进行了详细的综述^[8-10]。TLR 受体的激活取决于 TLR 受体的结构特性、不同细胞表面 TLR 受体的表达分布,以及特异性配体的结构特性等。本课题组研究发现鼠李糖乳酸杆菌 *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) 通过调控 TLR2、TLR4 和 TLR9 受体表达,介导猪肠上皮细胞炎症免疫反应,发挥益生效应(未发表)。

TLR9 受体不仅分布于肠道细胞膜表面^[11],同样存在于动物肠道细胞胞浆的包涵体中,通过识别并结合菌体未甲基化 CpG DNA 激活下游信号通路^[12]。TLR9 作为未甲基化 CpG DNA 特异性识别受体,与其他 TLR 家族受体具有结构相似性。TLR9 受体胞外结构域(Extracellular domain, ECD)由 25 个富含赖氨酸结构域(Leucine-rich repeats, LRRs)与 1 个富含半胱氨酸结构域组成,胞内结构域由 α 螺旋与 β 折叠构成,胞外结构域 ECD 通过跨膜结构域与胞内结构域连接。胞外结构域 ECD 识别未甲

甲基化 CpG DNA 后,胞内结构域能够活化相关蛋白,激活细胞下游级联信号通路,从而产生相应免疫应答,如产生细胞因子、诱导细胞增殖或凋亡等^[13-14]。研究发现,TLR9 通过胞外结构域 ECD 含有的 LRR 与 CpG 基序相结合,从而激活胞内相应信号激酶,LRR 中 LRR2、LRR5 和 LRR11 对 CpG 基序具有较强的亲和力,尤其是 LRR11^[15]。同时研究发现,TLR9 胞外结构域的 C 端和 N 端在结合激活 TLR9 受体过程中发挥重要作用,进一步研究发现 C 端的组氨酸 His505、谷氨酰胺 Gln510、组氨酸 His530 和丝氨酸 Tyr554 在 TLR9 受体激活中必不可少^[16]。

3 未甲基化 CpG DNA 经由 TLR9 介导的肠道免疫调节作用

3.1 未甲基化 CpG 免疫调节的信号通路

肠道微生物富含未甲基化 CpG 的 DNA 片段随

细菌的复制、凋亡等过程释放至肠道内环境中。由未甲基化 CpG DNA 与肠道 TLR9 结合,通过骨髓样分化因子 88 (Myeloid differentiation factor 88, MyD88) 介导,激活下游的白介素受体相关激酶-1 (Interleukin-1 receptor-associated kinase, IRAK-1)、肿瘤坏死因子相关因子 6 (Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6) 与转化生长因子活化激酶 1 (Transforming growth factor-activated kinase 1, TAK1),从而激活核因子 κ B (Nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路与丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路。激活的 MAPK 信号通路包括 p38MAPK 信号通路、细胞外调节蛋白激酶 1/2 (Extracellular regulated protein kinases, ERK1/2) 信号通路以及 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号通路,激活的信号分子通过进入胞核调控 DNA 的

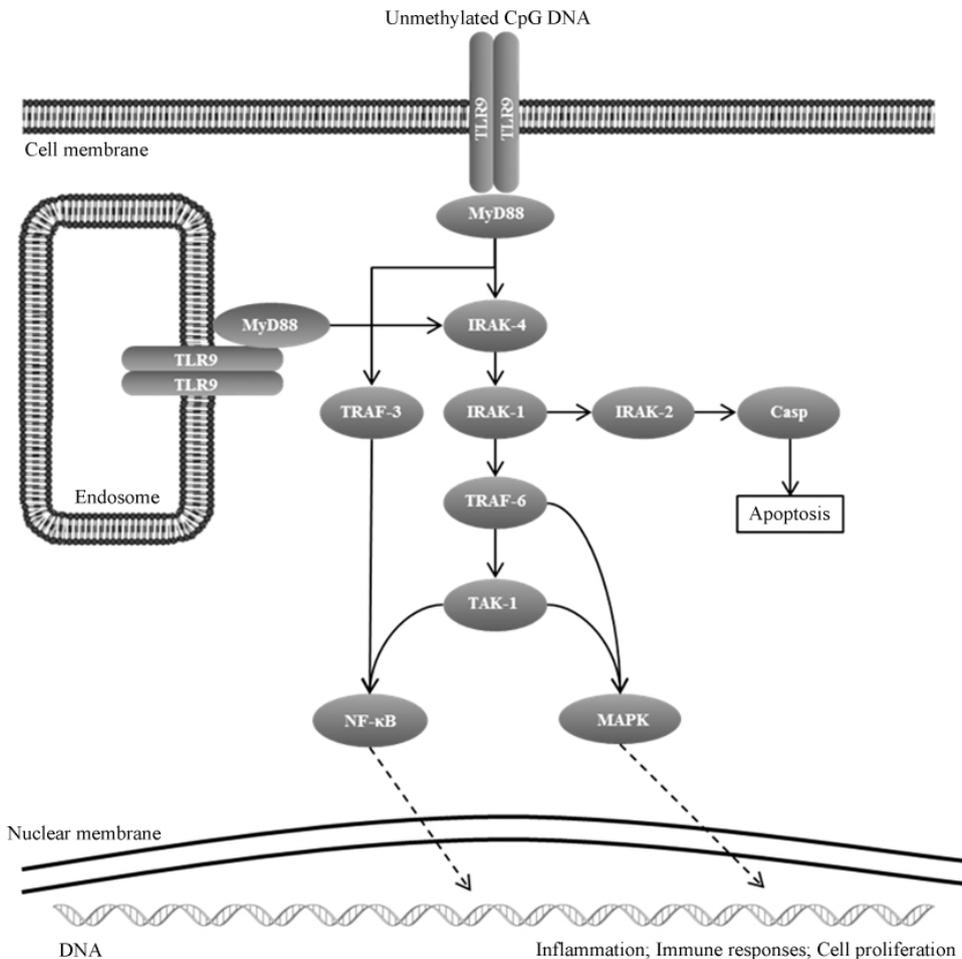


图 1. 未甲基化 CpG DNA/TLR9 MyD88 依赖信号通路图^[13]

Figure 1. Schematic representation of unmethylated CpG DNA/TLR9 MyD88-dependent signaling pathway^[13].

转录,引起肠道细胞产生细胞因子、介导免疫调控、促使细胞增殖或募集免疫细胞等^[13-14]。同时,在特定的外环境因子的刺激下,IRAK-4 蛋白选择性激活含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (CysteinyI aspartate specific proteinase, Caspase),介导细胞凋亡信号通路引起受感染肠道细胞程序性死亡(图1)。

因此,未甲基化 CpG DNA 与肠道细胞 TLR9 识别后,通过 NF- κ B 和 MAPK 信号通路增强细胞的免疫应答功能,在维持动物肠道稳态中发挥重要的作用^[13]。未甲基化 CpG DNA 作用于人结肠癌细胞 HT-29,通过 TLR9 介导的 MyD88/NF- κ B 信号通路引起 HT-29 细胞中白介素-8 (Interleukin-8, IL-8) 的表达分泌增加^[17]。与以上研究结果相一致,本课题组研究发现鼠李糖乳酸杆菌 LGG 的未甲基化 CpG DNA 能够被猪肠上皮细胞 TLR9 受体识别,并且激活下游 NF- κ B、p38MAPK 和 ERK1/2 信号通路,引起细胞致炎性细胞因子表达升高,表明 LGG 的未甲基化 CpG DNA 介导 TLR9 激活炎性信号通路,在肠道粘膜免疫中发挥免疫刺激效应(未发表)。

3.2 未甲基化 CpG DNA 对肠道的免疫调节作用

目前国内外主要采用人工合成的未甲基化 CpG ODN 代替肠道微生物未甲基化 CpG DNA,用于研究动物肠道免疫应答。研究发现未甲基化 CpG DNA 不仅能够被机体肠道上皮细胞 TLR9 受体识别,引起肠道上皮细胞中致炎性细胞因子(肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IFN- γ 等)、CC 类趋化因子(CCL2、CCL7 等)以及 CXC 类趋化因子(CXCL1、CXCL10 等)蛋白分泌上升^[18],而且未甲基化 CpG DNA 作为一类肠道免疫刺激因子,还可促进动物肠道中树突状细胞(Dendritic cells, DC)和巨噬细胞等抗原提呈细胞(Antigen presenting cell, APC)大量增殖,分泌 CC 类趋化因子、单核细胞趋化蛋白-1 (Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 和巨噬细胞炎症蛋白 (Macrophage inflammatory protein, MIP)^[19]。未甲基化 CpG DNA 通过 TLR9 受体介导的信号通路增强肠道上皮细胞、APC 细胞免疫应答反应,在调控机体肠道固有免疫应答中发挥重要作用,维持动物肠道稳态。

未甲基化 CpG DNA 不仅能够调控机体肠道固有免疫应答,而且能够通过肠道上皮细胞、APC 细胞等间接介导机体肠道适应性免疫应答。未甲基化

CpG DNA 调节动物肠道适应性免疫应答的研究主要集中于小鼠肠道炎症的预防、治疗等方面。研究利用未甲基化 CpG ODN 饲喂新生小鼠和成年小鼠,未甲基化 CpG ODN 被小鼠肠道粘膜层 APC 细胞如 DC 细胞识别,诱导 B 淋巴细胞增殖分化分泌抗体,也促进辅助性 T 细胞 Th1 细胞因子 IL-12p40 和 IFN- γ 表达,增强小鼠肠道免疫细胞免疫应答反应^[18],表明未甲基化 CpG DNA 能够通过激活 APC 细胞间接调控小鼠肠道适应性免疫应答反应。最新研究进一步发现,对患有肠道炎症的小鼠饲喂未甲基化 CpG ODN 后,小鼠肠道 DC 细胞 TLR9 受体特异性识别未甲基化 CpG ODN,DC 细胞激活后分泌相关细胞因子和趋化因子,从而活化小鼠肠道调节性 B 细胞 (Regulatory B cell, Breg cell) 分泌 IL-10,进一步调节小鼠肠道适应性免疫反应,减轻小鼠肠道炎症反应^[20]。研究利用未甲基化 CpG ODN 刺激患有慢性肠道炎症的小鼠试验中,未甲基化 CpG ODN 通过 TLR9 信号通路激活小鼠肠道免疫反应,刺激肠道 B 淋巴细胞活化,分泌大量免疫球蛋白 A (Immunoglobulin A, IgA),从而缓解小鼠肠道炎症免疫反应^[21]。另有研究报道未甲基化 CpG ODN 刺激小鼠肠道 DC 细胞分泌致炎性细胞因子,引起 CD8⁺ T 淋巴细胞增殖;与此同时,未甲基化 CpG ODN 激活的 DC 细胞间接介导辅助性 T 细胞 Th1 和 Th17 免疫应答,诱导细胞毒性 T 淋巴细胞 (Cytotoxic lymphocyte, CTL) 活性^[22]。以上研究均表明,未甲基化 CpG DNA 通过小鼠肠道 APC 细胞的递呈作用,活化免疫细胞功能,进而间接介导小鼠肠道的适应性免疫应答。基于未甲基化的 CpG DNA 调控小鼠肠道免疫应答的众多研究成果,未甲基化的 CpG DNA 调控猪肠免疫应答的研究亦取得进展。对新生仔猪鼻腔给予未甲基化 CpG ODN 刺激新生仔猪肠道免疫应答,发现未甲基化 CpG ODN 显著增强肠道淋巴结中辅助性 T 细胞 Th1 的免疫应答,致炎性细胞因子 TNF- α 的表达显著升高^[23]。另有研究发现在预防由大肠杆菌引起的断奶仔猪肠道腹泻试验中,利用未甲基化 CpG ODN 饲喂断奶仔猪能够显著增加猪肠道 B 细胞免疫球蛋白 M (Immunoglobulin M, IgM) 和免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG) 的分泌,同时显著增加辅助性 T 细胞 Th1 中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-12p40 和 IL-1 β ,以及 Th2 中 IL-4、IL-6 的表达^[24]。以上未甲基化 CpG DNA 调节猪肠道免疫

的研究表明, 未甲基化 CpG DNA 通过激活猪肠道 APC 细胞、活化 B 细胞而引起大量抗体分泌, 同时可以调控 IgM 的转变类别以及肠道辅助性 T 细胞 Th1 与 Th2 免疫应答平衡, 在猪肠道免疫应答系统中发挥重要的调节功能。结合目前本课题组有关微生物未甲基化 CpG DNA 的研究, 未甲基化 CpG DNA 通过被机体肠道上皮细胞、APC 细胞 TLR9 受体识别, 激活细胞分泌免疫因子, 引起肠道固有免疫应答的同时, 还可活化免疫细胞间接调节肠道适应性免疫应答。可见, 未甲基化 CpG DNA 在介导动物肠道固有免疫和适应性免疫应答中发挥着重要的作用。

然而, 未甲基化 CpG DNA 与机体免疫系统相互作用的机制并没有完全了解。使用高剂量未甲基化 CpG ODN 刺激小鼠浆细胞样树突细胞 (plasmacytoid dendritic cells, pDCs), 发现高剂量的未甲基化 CpG ODN 并没有激活 pDC 细胞免疫应答, 反而呈现免疫耐受效应。通过进一步检测 pDC 细胞中细胞信号通路分子表达, 发现高剂量未甲基化 CpG ODN 与 pDC 细胞 TLR9 识别后, 通过 TLR9-IRF3 (Interferon regulatory factor 3, 干扰素调节因子 3) 信号通路, 而非 TLR9-MyD88 信号通路, 激活下游转化生长因子 β (Transforming growth factor-beta, TGF- β), 从而引起 pDC 细胞免疫耐受效应^[25]。因此, 有必要在目前研究基础上, 对未甲基化 CpG DNA/TLR9 介导的信号通路进行进一步的研究。

4 未甲基化 CpG DNA 在调节机体免疫中的应用

人工合成的未甲基化 CpG ODN 代替肠道微生物未甲基化 CpG DNA 被广泛用于预防、治疗动物肠道疾病, 具有重要的免疫佐剂作用。研究发现未甲基化 CpG ODN 通过激活人和小鼠 APC 细胞 (pDC 细胞) 分泌表达细胞因子、趋化因子等, 从而募集免疫 B 细胞增殖分化, 在预防和治疗感染性疾病中发挥着重要的免疫佐剂功能^[26]。研究显示肠道微生物菌群未甲基化 CpG DNA 能够通过增强辅助性 T 细胞 Th1 免疫应答, 调节动物肠道自身免疫紊乱^[5]。

未甲基化 CpG DNA 作为一类免疫刺激因子, 具有免疫佐剂效应。最新研究发现, 利用未甲基化 CpG ODN 处理鸡髓系树突状细胞 (Bone marrow derived dendritic cells, BMDC), 通过形态学、表型鉴定以及活性功能检测, 发现未甲基化 CpG ODN 能够活化 BMDC 细胞, 活化的 BMDC 细胞可进一步诱导鸡 T 淋巴细胞增殖分化并产生免疫应答反应^[27]。对鸡饲喂未甲基化 CpG ODN, 未甲基化 CpG ODN 显著增强鸡肠道粘膜免疫应答, 同时激活机体免疫系统功能, 通过分泌大量 IgA 抵抗禽流感病毒 H5N1 侵袭, 具有免疫佐剂效应^[28]。未甲基化 CpG ODN 预处理的军曹鱼肠道被细菌感染后, 与单独细菌感染的鱼类相比较, 成活率升高, 且无明显肠道组织损伤和炎症^[29]。未甲基化 CpG ODN 在刺激南美对虾 12 h 后, 能够显著提高南美对虾血液中 TNF- α 的表达量以及一氧化氮 (NO) 的含量, 增强机体的免疫应答能力^[30]。研究对新生仔猪鼻腔给予人工合成的未甲基化 CpG ODN 与先天免疫调节肽 HH2 (Innate defense regulator peptides-HH2, IDR-HH2) 复合物 (CpG-IDR-HH2 complex), 发现仔猪肠道细胞因子、趋化因子 mRNA 表达量显著上升; 同时对受致病性大肠杆菌感染的新生仔猪鼻腔给予未甲基化 CpG ODN 与 IDR-HH2 复合物, 发现仔猪肠道致炎性细胞因子 TNF- α 的 mRNA 水平显著降低^[23], 研究结果表明未甲基化 CpG DNA 协同 IDR 增强猪肠道粘膜免疫抵抗病原微生物感染, 同时对于肠道炎症有免疫治疗效果, 在机体肠道中发挥重要的免疫佐剂作用。另有研究采用人工合成的未甲基化 CpG ODN 与 IDR-HH2 形成的免疫佐剂复合物饲喂新生仔猪, 能够增加猪肠道免疫细胞的细胞因子 IL-12、TNF- α 和 IFN- γ 的表达, 同时显著增强辅助性 T 细胞 Th1 (分泌 IgG 抗体) 和 Th2 (分泌 IgA 抗体) 的免疫应答, 并可抵抗伪狂犬病毒感染^[31], 研究结果进一步佐证未甲基化 CpG DNA 与 IDR-HH2 协同介导机体肠道免疫功能; 还有相关研究发现未甲基化 CpG DNA/IL-6 复合物佐剂在猪生产养殖中可有效地防止猪瘟的发生^[32]。以上已有研究均表明, 未甲基化 CpG DNA 作为一种肠道免疫佐剂, 通过与其他物质构成复合物的形式, 能够显著提高动物机体免疫功能, 在实际动物生产中具有重要的应用价值。

5 展望

动物肠道免疫系统是动物机体防御病原微生物侵袭的第一道免疫防线。以上综述表明,作为一类免疫刺激因子,微生物未甲基化 CpG DNA 可激活动物肠道免疫系统、增强机体免疫应答能力,从而抵御病原微生物的侵袭。未甲基化 CpG DNA 对动物具有免疫调节作用,能够直接或间接介导机体固有免疫和适应性免疫应答,是国内外免疫佐剂开发利用的热点。然而,目前未甲基化 CpG DNA 调节机体肠道免疫应答的机制尚未完全明晰,应用于实际生产的安全性尚未被完全阐明,需要进行更多研究来验证。因此,在目前国内外研究基础上,有必要进一步深入研究未甲基化 CpG DNA 在动物肠道免疫调节中的作用,阐明未甲基化 CpG DNA/TLR9 介导动物肠道粘膜免疫的机制,为开发和利用未甲基化 CpG DNA 作为肠道免疫佐剂提供理论基础,将对预防和治疗动物肠道疾病、提高动物免疫力、促进动物健康等具有重要意义。本课题组致力于乳酸杆菌肠道粘膜免疫调控效应及其机制研究,业已发现鼠李糖乳酸杆菌 LGG 的未甲基化 CpG DNA 具有肠道粘膜免疫调节效应,后续将进一步分析益生菌未甲基化 CpG DNA 肠道免疫调节效应及其详细分子信号机制,为更好开发利用益生菌提供理论基础。

参考文献

- [1] Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature Reviews. Immunology*, 2013, 13 (11) : 790-801.
- [2] Cinar MU, Islam MA, Proll M, Kocamis H, Tholen E, Tesfaye D, Looft C, Schellander K, Uddin MJ. Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in porcine PBMCs in response to LPS and LTA. *BMC Research Notes*, 2013, 6: 56.
- [3] Lemaitre B, Girardin SE. Translation inhibition and metabolic stress pathways in the host response to bacterial pathogens. *Nature Reviews. Microbiology*, 2013, 11 (6) : 365-369.
- [4] Patil V, Ward RL, Hesson LB. The evidence for functional non-CpG methylation in mammalian cells. *Epigenetics : Official Journal of the DNA Methylation Society*, 2014, 9 (6) .
- [5] Kant R, Vos WM, Palva A, Satokari R. Immunostimulatory CpG motifs in the genomes of gut bacteria and their role in human health and disease. *Journal of Medical Microbiology*, 2014, 63 (Pt 2) : 293-308.
- [6] Iliev DB, Hansen T, Jørgensen SM, Krasnov A, Jørgensen JB. CpG-and LPS-activated MAPK signaling in *in vitro* cultured salmon (*Salmo salar*) mononuclear phagocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35 (4) : 1079-1085.
- [7] O' Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 2013, 13 (6) : 453-460.
- [8] Gao K, Wang H, Zhang W, Liu J. Functions of intestinal epithelial barriers modulated by probiotics and mechanisms. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013 (09) : 1936-1945. (in Chinese)
高侃, 汪海峰, 章文明, 刘建新. 益生菌调节肠道上皮屏障功能及作用机制. *动物营养学报*, 2013 (09) : 1936-1945.
- [9] Wang H, Zhang W, Wang Y, Liu J. Cell surface components of lactobacilli: recent advances on their adherence mechanism of action in the gastrointestinal tract. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2011 (02) : 179-186. (in Chinese)
汪海峰, 章文明, 汪以真, 刘建新. 乳酸杆菌与肠道黏附相关表面因子及其机制的研究进展. *动物营养学报*, 2011 (02) : 179-186.
- [10] Zhang W, Wang H, Liu J. Mechanism of action of probiotic function of lactobacilli. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012 (03) : 389-396. (in Chinese)
章文明, 汪海峰, 刘建新. 乳酸杆菌益生作用机制的研究进展. *动物营养学报*, 2012 (03) : 389-396.
- [11] Kivit S, Tobin MC, DeMeo MT, Fox S, Garrsen J, Forsyth CB, Keshavarzian A, Landay AL. In vitro evaluation of intestinal epithelial TLR activation in preventing food allergic responses. *Clinical Immunology*, 2014.
- [12] Kamdar K, Nguyen V, DePaolo RW. Toll-like receptor signaling and regulation of intestinal immunity. *Virulence*, 2013, 4 (3) : 207-212.
- [13] Hofmann C, Dunger N, Doser K, Lippert E, Siller S, Edinger M, Falk W, Obermeier F. Physiologic TLR9-CpG-DNA interaction is essential for the homeostasis of the intestinal immune system. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2014, 20 (1) : 136-143.
- [14] Rose II WA, Sakamoto K, Leifer CA. TLR9 is important for protection against intestinal damage and for intestinal repair. *Scientific Reports*, 2012, 2.

- [15] Pan X, Yue J, Ding G, Li B, Liu X, Zheng X, Yu M, Li J, Jiang W, Wu C. Leucine-rich repeat 11 of Toll-like receptor 9 can tightly bind to CpG-containing oligodeoxynucleotides, and the positively charged residues are critical for the high affinity. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287 (36) : 30596-30609.
- [16] Suwanti S, Yamazaki T, Svetlana C, Hanagata N. Recognition of CpG oligodeoxynucleotides by human Toll-like receptor 9 and subsequent cytokine induction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 430 (4) : 1234-1239.
- [17] Pedersen G, Andresen L, Matthiessen MW, Rask-Madsen J, Brynskov J. Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium. *Clinical and Experimental Immunology*, 2005, 141 (2) : 298-306.
- [18] Lacroix-Lamande S, Rochereau N, Mancassola R, Barrier M, Clauzon A, Laurent F. Neonate intestinal immune response to CpG oligodeoxynucleotide stimulation. *PLoS One*, 2009, 4 (12) : e8291.
- [19] Cheng Q, Xu C, Zhang L, Li J, Cao T, Zhang M. Administered CpG oligodeoxynucleotide induces mRNA expression of CXC and CC chemokines at the intestinal mucosa and PBMCs in piglets. *International Immunopharmacology*, 2010, 10 (5) : 611-618.
- [20] Nishida A, Lau C, Mizoguchi E, Mizoguchi A. Regulatory B cells in mouse models of intestinal inflammation. *Methods in Molecular Biology*, 2014, 1190: 227-241.
- [21] Blaas SH, Stieber-Gunckel M, Falk W, Obermeier F, Rogler G. CpG-oligodeoxynucleotides stimulate immunoglobulin A secretion in intestinal mucosal B cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 2009, 155 (3) : 534-540.
- [22] Fujimoto K, Karupuchamy T, Takemura N, Shimohigoshi M, Machida T, Haseda Y, Aoshi T, Ishii KJ, Akira S, Uematsu S. A new subset of CD103 + CD8alpha + dendritic cells in the small intestine expresses TLR3, TLR7, and TLR9 and induces Th1 response and CTL activity. *Journal of Immunology*, 2011, 186 (11) : 6287-6295.
- [23] Yang J, Mao M, Zhang S, Li H, Jiang Z, Cao G, Cao D, Wang X, Zhang L. Innate defense regulator peptide synergizes with CpG ODN for enhanced innate intestinal immune responses in neonate piglets. *International Immunopharmacology*, 2012, 12 (2) : 415-424.
- [24] Delisle B, Calinescu C, Mateescu MA, Fairbrother JM, Nadeau E. Oral immunization with F4 fimbriae and CpG formulated with carboxymethyl starch enhances F4-specific mucosal immune response and modulates Th1 and Th2 cytokines in weaned pigs. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences : a Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques*, 2012, 15 (5) : 642-656.
- [25] Volpi C, Fallarino F, Pallotta MT, Bianchi R, Vacca C, Belladonna ML, Orabona C, De Luca A, Boon L, Romani L, Grohmann U, Puccetti P. High doses of CpG oligodeoxynucleotides stimulate a tolerogenic TLR9-TRIF pathway. *Nature Communications*, 2013, 4: 1852.
- [26] Gungor B, Yagci FC, Tincer G, Bayyurt B, Alpdundar E, Yildiz S, Ozcan M, Gursel I, Gursel M. CpG ODN nanorings induce IFNalpha from plasmacytoid dendritic cells and demonstrate potent vaccine adjuvant activity. *Science Translational Medicine*, 2014, 6 (235) : 235ra261.
- [27] Fu J, Liang J, Kang H, Lin J, Yu Q, Yang Q. The stimulatory effect of different CpG oligonucleotides on the maturation of chicken bone marrow-derived dendritic cells. *Poultry Science*, 2014, 93 (1) : 63-69.
- [28] Fu J, Liang J, Kang H, Lin J, Yu Q, Yang Q. Effects of different CpG oligodeoxynucleotides with inactivated avian H5N1 influenza virus on mucosal immunity of chickens. *Poultry Science*, 2013, 92 (11) : 2866-2875.
- [29] Byadgi O, Puteri D, Lee J, Chang T, Lee Y, Chu C, Cheng T. The Effect of TLR9 Agonist CpG Oligodeoxynucleotides on the Intestinal Immune Response of Cobia (*Rachycentron canadum*). *Journal of Immunology Research*, 2014, 2014: 273284.
- [30] Sun R, Wang M, Wang L, Yue F, Yi Q, Huang M, Liu R, Qiu L, Song L. The immune responses triggered by CpG ODNs in shrimp *Litopenaeus vannamei* are associated with LvTolls. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 43 (1) : 15-22.
- [31] Cao D, Li H, Jiang Z, Cheng Q, Yang Z, Xu C, Cao G, Zhang L. CpG oligodeoxynucleotide synergizes innate defense regulator peptide for enhancing the systemic and mucosal immune responses to pseudorabies attenuated virus vaccine in piglets in vivo. *International Immunopharmacology*, 2011, 11 (6) : 748-754.
- [32] Li D, Chen J, Zhang H, Yang X, Wan X, Cheng C, Li Y, Wang Z, Lv X, Wang H, Wang H, Li J, Gao R. Improvement of the immunity of pig to Hog cholera vaccine by recombinant plasmid with porcine interleukin-6 gene and CpG motifs. *Vaccine*, 2011, 29 (22) : 3888-3894.

Advances in immunomodulation of microbial unmethylated CpG DNA on animal intestinal tract – A review

Kan Gao, Li Liu, Haifeng Wang*

College of Animal Science and Technology, Zhejiang A&F University, Lin'an 311300, Zhejiang Province, China

Abstract: Unmethylated cytosine-guanine (CpG) dinucleotides motifs in bacterial DNA can be recognized by specific Toll-like receptor 9 (TLR9) in intestinal cells. As one of the intestinal immunostimulatory factors, unmethylated CpG DNA can modulate intestinal innate immune responses directly and adaptive immune responses indirectly. There is a great prospect for unmethylated CpG DNA as an immunomodulator in the rapy of intestinal diseases. This article illustrated the basic concepts of unmethylated CpG DNA, the characteristics of TLR9. We also reviewed specific applications of unmethylated CpG DNA as adjuvants in modulating intestinal immune responses. At last, we elaborated the research and application prospects of CpG DNA in the future.

Keywords: intestine, microbe, unmethylated CpG DNA, Toll-like receptor 9 (TLR9), immunomodulation

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31172221) and by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (Y14C170018)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-571-63743313; E-mail: wanghaifengzj@sohu.com

Received: 16 August 2014 / Revised: 1 December 2014

《微生物学报》EndNote Style

2013年1月编制

EndNote 文献管理软件能够帮助科研人员更好地进行学术研究、学习以及论文的撰写,这已经被越来越多的人熟悉、接受。为了方便作者写作与投稿,我们编制了“《微生物学报》EndNote Style”文件。利用 EndNote 轻松调取收集的文献,自动按照《微生物学报》的格式生成论文的参考文献。

1. 建议作者在投稿本刊时使用“《微生物学报》EndNote Style”文件,这会让您在写作过程中更加轻松快乐。请到本刊网站的“下载专区”中获取这个文件。

2. 将“《微生物学报》EndNote Style”文件下载后,复制到 EndNote 安装文件夹下面的 Style 子目录中。

3. 在使用 EndNote 文献管理软件插入文献后,投稿前,请用 EndNote 软件的“Convert to Plain Text”功能,将文章中的参考文献转化成 Plain Text 格式,以便于编辑修改。【注:本刊的这个文件是在 EndNote X5 环境下编制的,因此无法在低于 X5 版本的环境打开和使用。】

4. 因本刊是中文期刊,需要作者对 3 处手工调节。具体写法参见本刊网站“投稿须知”中的“参考文献”。

(1) 西文刊名:2009 年开始西文刊名需要全拼,为的是保证刊名的书写准确。

(2) 非英文的期刊:以尊重原始文种为主,2012 年底开始采用双语表述。先英文文献后原文献,并在英文文献的后面标出“文种”。

(3) 译著:需要给出外国作者的原姓名。

致谢:“《微生物学报》EndNote Style”是在本刊副主编、中国军事医学科学院微生物流行病学研究所杨瑞馥先生的建议下开始的,杨老师实验室的崔玉军博士按照《微生物学报》的要求编辑了该文件。在此,谨向他们表示衷心地感谢!