

解毒祛瘀滋肾方对小鼠单核巨噬细胞 Toll 样受体 9 信号通路的影响

吴德鸿¹ 范永升² 谢冠群² 季巾君² 徐 莉²

摘要 **目的** 通过研究解毒祛瘀滋肾方对 CpG 寡脱氧核苷酸 (CpG oligodeoxynucleotide, CpG ODN) 刺激后小鼠单核巨噬细胞 Toll 样受体 9 (Toll like receptor 9, TLR9) 信号通路的影响,探讨解毒祛瘀滋肾方治疗系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 增效减毒的机制。**方法** 体外培养小鼠单核巨噬细胞,随机分为空白血清组、CpG ODN 刺激组、CpG ODN 加地塞米松组及 CpG ODN 加含药血清组。干预 24 h 后收集细胞,采用 RT-PCR 法检测 TLR9、髓样分化因子 88 (MyD88)、核转录因子- κ B (NF- κ B) 及干扰素- α (IFN- α) mRNA 的表达;Western blot 法检测 TLR9、NF- κ B 蛋白表达;双荧光素酶报告基因分析 NF- κ B 转录活力的变化。**结果** 与空白血清组比较,CpG ODN 刺激组 TLR9、MyD88、NF- κ B、IFN- α mRNA 表达、TLR9、NF- κ B 蛋白表达和 NF- κ B 转录活力均升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 CpG ODN 刺激组比较,CpG ODN 加地塞米松组 MyD88、NF- κ B、IFN- α mRNA 表达、NF- κ B 蛋白表达和 NF- κ B 转录活力均下降,差异有统计学意义 ($P < 0.01$), CpG ODN 加含药血清组 TLR9、MyD88、NF- κ B、IFN- α mRNA、TLR9、NF- κ B 蛋白表达和 NF- κ B 转录活力均下降,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** 解毒祛瘀滋肾方治疗 SLE 所起到增效减毒的作用可能是通过调控 TLR9 信号通路来实现的。

关键词 系统性红斑狼疮;小鼠单核巨噬细胞;解毒祛瘀滋肾方;Toll 样受体 9 信号通路

Effect of Jiedu Quyu Zishen Recipe on TLR9 Signal Pathway of Murine Macrophage Cells WU De-hong¹, FAN Yong-sheng¹, XIE Guan-qun², JI Jin-jun², and XU Li² 1 First School of Clinical Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053), China; 2 College of Basic Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053), China

ABSTRACT **Objective** To explore efficacy enhancing and detoxification roles of Jiedu Quyu Zishen Recipe (JQZR) in treating systemic lupus erythematosus (SLE) by studying its effect on Toll like receptor 9 (TLR9) signal pathway of murine macrophage cells after JQZR stimulated CpG oligodeoxynucleotide (CpG ODN). **Methods** Murine macrophage cells *in vitro* cultured were randomly divided into 4 groups, i.e., the blank serum group, the CpG ODN stimulus group, the CpG ODN + dexamethasone group, the CpG ODN + medicated serum group. Murine macrophage cells were collected after 24-h intervention. The expression of TLR9, myeloid differentiation factor 88 (MyD88), NF- κ B, IFN- α mRNA were analyzed by RT-PCR. The expression of TLR9 and NF- κ B protein were analyzed by Western blot. Changes of the NF- κ B transcriptional activity were assayed by Dual-Luciferase reporter assay system. **Results** mRNA expressions of TLR9, MyD88, NF- κ B, and IFN- α , protein expressions of TLR9 and NF- κ B, and NF- κ B transcriptional activities were enhanced, showing statistical difference when compared with those of the blank serum group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the CpG ODN stimulus group, mRNA expressions of MyD88, NF- κ B, and IFN- α , the protein expression of NF- κ B and the NF- κ B transcriptional activities decreased in the CpG ODN + dexamethasone group with statistical difference ($P < 0.01$). Com-

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(No. 2014CB543001);国家自然科学基金资助项目(No.81202628, No.81403289, No. 81373633);浙江省自然科学基金资助项目(No. LQ14H270003);浙江省中医药科学研究基金资助项目(No. 2013ZA063)

作者单位:1. 浙江中医药大学第一临床医学院(杭州 310053);2. 浙江中医药大学基础医学院(杭州 310053)

通讯作者:徐 莉, Tel: 13003691133, E-mail: xulihb@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.04.0466

pared with the CpG ODN stimulus group, mRNA expressions of TLR9, MyD88, NF- κ B, and IFN- α , protein expressions of TLR9 and NF- κ B, and NF- κ B transcriptional activities were decreased in CpG ODN + medicated serum group with statistical difference ($P < 0.01$). Conclusion Efficacy enhancing and detoxification roles of JQZR in treatment of SLE might be realized through regulating TLR9 signal pathways.

KEYWORDS systemic lupus erythematosus; murine macrophage cell; Jiedu Quyu Zishen Recipe; TLR9 signal pathway

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种以抗核抗体为代表的自身抗体为特征累及多系统的炎症性自身免疫性疾病。现代医学对 SLE 缺乏根本的去病因疗法,迄今为止糖皮质激素(glucocorticoids, GC)依然是临床上治疗 SLE 的关键和基础药物,但长期或较大剂量使用 GC 可引起许多不良反应:如肾上腺皮质醇增多症、代谢紊乱、消化性溃疡、骨质疏松症、继发性感染、肾上腺皮质机能不全等^[1]。因此,减少 GC 治疗 SLE 的不良反应和提高其疗效是现代医学亟需解决的问题。

本实验将人工合成 CpG 寡脱氧核苷酸(CpG oligodeoxynucleotide, CpG ODN)添加到小鼠单核巨噬细胞中,诱导 Toll 样受体 9 (toll like receptor 9, TLR9)信号通路激活,运用解毒祛瘀滋肾方含药血清进行干预,观察其对 TLR9 信号通路的影响,探讨解毒祛瘀滋肾方治疗 SLE 增效减毒的作用机制。

材料与方法

1 动物与细胞 20 只雄性 SD 大鼠,清洁级,6~8 周龄,体重(200 ± 20)g,由浙江中医药大学动物实验中心购进(动物合格证号:SYXK2008-0115)。小鼠单核巨噬细胞株(RAW 264.7),购自中国科学院上海生命科学研究院。

2 药物 解毒祛瘀滋肾方药物组成:干地黄 15 g 炙鳖甲 12 g 升麻 9 g 七叶一枝花 15 g 青蒿 12 g 积雪草 15 g 赤芍 12 g 炒薏苡仁 15 g 佛手片 9 g 生甘草 6 g,由浙江中医药大学中药饮片厂提供。上述中药材以单蒸水 800 mL 煎煮 1 h,共煎 2 次,将 2 次的中药水煎剂混合后,再将中药水煎剂浓缩成生药含量为 1 g/mL。地塞米松(Sigma 公司,100 mg,批号:D1756);CpG ODN 由生工生物工程(上海)有限公司合成序列:TCCATGACGTTCTGATGCT。

3 主要试剂及仪器 胎牛血清(Hyclone,批号:10100-147);DMEM 高糖培养基(GIBCO 12800);总 RNA 提取试剂为 TRIzol (Invitrogen 15596-026);RIPA 蛋白裂解液(碧云天生物技术公司,P0013B);BCA 蛋白定量测定试剂盒(康为世纪

CW0014);RT-PCR 试剂盒(Takara, RR014A);兔抗人 TLR9(Cell signaling 5845)、NF- κ B 抗体(Cell signaling 6956)和二抗羊抗兔 RDye 680 (LICOR 926-32221),双荧光素酶报告基因分析试剂盒(Promega, E1910)。PCR 仪(Eppendorf,型号:621BR09074),凝胶电泳仪(北京六一仪器厂,型号:DYY-6C),凝胶成像仪(Bio-Rad,型号:720BK/01492),垂直电泳仪及转印系统(BIO-RAD,型号:041BK91383),红外激光双色成像系统(基因有限公司,型号:UL301-1)。

4 方法

4.1 小鼠单核巨噬细胞的培养 从液氮罐中取出标记小鼠单核巨噬细胞,复苏,用含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。培养 48 h 后,显微镜下观察细胞生长情况,当细胞进入对数生长期后长满板底的 80% 为传代下限。

4.2 含药血清制备 将 20 只 SD 大鼠随机分为空白组和中药组,每组 10 只。其中空白组的大鼠以普通饮料喂养,予生理盐水灌胃 0.1 mL/(10 g · d);中药组的大鼠以解毒祛瘀滋肾方水煎剂按临床成人等效剂量的 10 倍进行灌胃 0.1 mL/(10 g · d),每天上下午各灌胃 1 次,共 5 次。于末次灌胃 1 h 后,腹主动脉取血,室温静置 4 h,以 3 000 r/min 离心 15 min 后吸取血清(如果在离心过程中发生溶血的则弃去不用),将同组血清混匀,用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌,56 °C 水浴灭活 30 min 后,分装后置于 -70 °C 冰箱中冻存,为细胞实验备用。

4.3 分组与干预 取生长状态良好的小鼠单核巨噬细胞株,胰酶消化计数并调细胞浓度为 5×10^5 /mL,移入 6 孔培养板,每孔加细胞悬液 1 mL,分为 4 组:空白血清组、CpG ODN 刺激组、CpG ODN 加地塞米松组、CpG ODN 加含药血清组;各组分别以下方法干预:(1)空白血清组:900 μ L 高糖 DMEM 培养液加 100 μ L 空白血清;(2)CpG ODN 刺激组:900 μ L 高糖 DMEM 培养液加 100 μ L 空白血清加 CpG ODN (0.5 μ mol/L);(3)CpG ODN 加地塞米松组:900 μ L 高糖 DMEM 培养液加 100 μ L 空白血清加

CpG ODN(0.5 μmol/L)加地塞米松溶液(加入后的终浓度为 40 ng/mL);(4) CpG ODN 加含药血清组: 900 μL 高糖 DMEM 培养液加 CpG ODN(0.5 μmol/L)加 100 μL 含药血清。

4.4 RT-PCR 实验 用 TRIzol 提取总 RNA,应用 RT-PCR 方法测定 TLR9、髓样分化因子 88(MyD88)、核转录因子-κB(NF-κB)、干扰素-α(IFN-α)的基因表达。PCR 反应条件:94℃变性 5 min(94℃,30 s;50℃,50 s;72℃,30 s)×30 个循环,72℃延伸 5 min,以 β-actin 为内参。引物根据 Primer 5.0 引物设计软件自行设计,再由生工生物工程(上海)有限公司合成,引物序列如下(表 1)。

表 1 目的基因引物序列

基因	引物序列	产物长度 (bp)
TLR9	上游:5'-TTCTCAAGACGGTGGATC-3'	412
	下游:5'-GGCGCAGTCGCACATAG-3'	
MyD88	上游:5'-TCCTGCGGTTCATCACT-3'	450
	下游:5'-GGGCCTTCCTAGACTTTG-3'	
NF-κB	上游:5'-GCCGTGGAGTACGACAA-3'	205
	下游:5'-CGGTTTCCCATTTAGTATGT-3'	
IFN-α	上游:5'-ATGGCTAGGCTCTGTGCTTTC-3'	267
	下游:5'-TGGGATCCACCTTCTCC-3'	
β-actin	上游:5'-ATCCGTAAGACCTCTATGCCAACA-3'	405
	下游:5'-GCCGTGGAGTACGACAA-3'	

反应结束后,取 PCR 反应液 10 μL,与溴酚蓝上样缓冲液按照 5:1 混合,在 70 V、30 mA 下经 1%琼脂糖凝胶电泳 60 min,以 β-actin 作为内参,当溴酚兰染料移动至距离胶块前沿 2~3 cm 处时,停止电泳。将完成电泳的胶块置于 BIO-RAD 凝胶成像仪中进行紫外光下拍照,然后对图像进行光密度分析。以目的基因的光密度值与对应的内参基因 β-actin 光密度值的比值作为该样品中目的基因的相对转录量。最后以目的基因的相对转录量为参数进行半定量统计分析。

4.5 Western blot 实验 由细胞刷收集 RAW264.7 单核巨噬细胞后加入 1×SDS 上样缓冲液裂解细胞,收集细胞蛋白样品,蛋白浓度由 BCA 法

检测,制备好的蛋白样品置-70℃冰箱保存备用。以 60 μg 蛋白/每泳道上样,经 SDS-PAGE 电泳后,电转膜至硝酸纤维素膜,分别加入 1:150 兔抗人 TLR9、NF-κB 一抗,4℃封闭过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入羊抗兔 RDye 680 二抗(1:15 000),室温振荡 2 h,将硝酸纤维素膜置于红外激光双色成像系统中进行红外激光扫描,再对图像进行光密度分析。以目的蛋白的灰度值与对应的内参蛋白 β-actin 的灰度值的比值作为该样品中目的蛋白的相对表达量。最后以目的蛋白的相对表达量为参数进行半定量统计分析。

4.6 双荧光素酶报告基因分析 取生长状态良好的 RAW264.7 单核巨噬细胞株,胰酶消化细胞计数并接种至 24 孔板,24 h 后共同转染 0.5 μg NF-κB 萤火虫荧光素酶报告质粒和 0.02 μg 内参照载体 pRL-SV40 海肾荧光素酶报告质粒,4 h 换液后,实验分为空白血清组、CpG ODN 刺激组、CpG ODN 加地塞米松组、CpG ODN 加含药血清组,每组设 6 个重复,24 h 后裂解细胞,按照双荧光素酶报告基因分析试剂盒的步骤测定 NF-κB 的转录活力,以海肾荧光素酶的值作为内参比值消除系统误差。

4.7 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析及独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

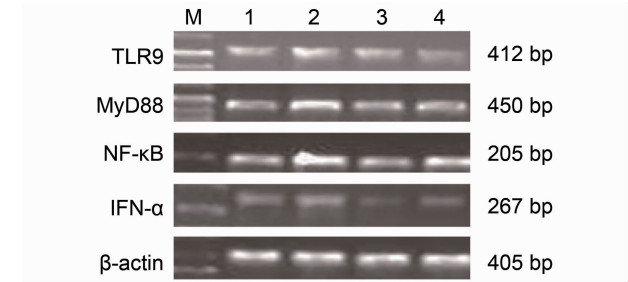
结 果

1 各组小鼠单核巨噬细胞 TLR9、MyD88、NF-κB 及 IFN-α mRNA 表达比较(表 2、图 1) 与空白血清组比较,CpG ODN 刺激组 TLR9、MyD88、NF-κB 及 IFN-α mRNA 表达均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 CpG ODN 刺激组比较,CpG ODN 加地塞米松组 TLR9 mRNA 的表达下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$),MyD88、NF-κB 及 IFN-α mRNA 表达均有所下降,差异有统计学意义($P < 0.01$),CpG ODN 加含药血清组 TLR9、MyD88、NF-κB 及 IFN-α mRNA 表达均下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 2 各组小鼠单核巨噬细胞 TLR9、MyD88、NF-κB 及 IFN-α mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TLR9	MyD88	NF-κB	IFN-α
空白血清	3	0.806 ± 0.003	0.891 ± 0.017	0.845 ± 0.024	0.497 ± 0.025
CpG ODN 刺激	3	1.003 ± 0.016 *	1.015 ± 0.034 *	1.021 ± 0.046 *	0.756 ± 0.055 *
CpG ODN 加地塞米松	3	0.946 ± 0.017	0.685 ± 0.045 Δ	0.777 ± 0.023 Δ	0.466 ± 0.074 Δ
CpG ODN 加含药血清	3	0.714 ± 0.023 Δ	0.817 ± 0.036 Δ	0.859 ± 0.025 Δ	0.561 ± 0.023 Δ

注:与空白血清组比较,* $P < 0.05$;与 CpG ODN 刺激组比较,Δ $P < 0.01$



注:M 为 DNA marker;1 为空白血清组;2 为 CpG ODN 刺激组;3 为 CpG ODN 加地塞米松组;4 为 ODN 加含药血清组

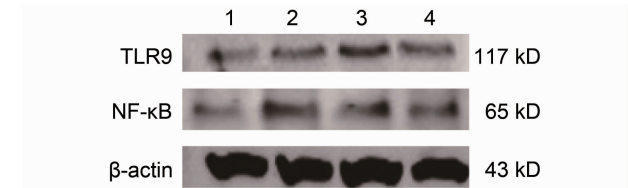
图 1 各组 TLR9、MyD88、NF-κB 及 IFN-α mRNA 表达比较图

2 各组小鼠单核巨噬细胞 TLR9 及 NF-κB 蛋白表达比较(表 3、图 2) 与空白血清组比较,CpG ODN 刺激组 TLR9、NFκ-B 蛋白表达均升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 CpG ODN 刺激组比较,CpG ODN 加地塞米松组 TLR9 蛋白表达下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$),NF-κB 蛋白表达下降,差异有统计学意义($P < 0.01$),ODN 加含药血清组 TLR9、NF-κB 蛋白表达均下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 3 各组小鼠单核巨噬细胞 TLR9 及 NF-κB 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TLR9	NF-κB
空白血清	3	0.078 ± 0.003	0.143 ± 0.006
CpG ODN 刺激	3	0.114 ± 0.005 *	0.232 ± 0.005 *
CpG ODN 加地塞米松	3	0.112 ± 0.007	0.131 ± 0.001 ^Δ
CpG ODN 加含药血清	3	0.084 ± 0.004 ^Δ	0.155 ± 0.005 ^Δ

注:与空白血清组比较,* $P < 0.01$;与 CpG ODN 刺激组比较,^Δ $P < 0.01$



注:1 为空白血清组;2 为 CpG ODN 刺激组;3 为 CpG ODN 加地塞米松组;4 为 CpG ODN 加含药血清组

图 2 各组 TLR9 及 NF-κB 蛋白表达图

3 各组小鼠单核巨噬细胞 NF-κB 转录活力比较(表 4) 与空白血清组比较,CpG ODN 刺激组的 NF-κB 转录活力升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 CpG ODN 刺激组比较,CpG ODN 加地塞米松组和 CpG ODN 加含药血清组 NF-κB 转录活力均下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 4 各组小鼠单核巨噬细胞 NF-κB 转录活力比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NF-κB 转录活力
空白血清	6	0.606 ± 0.054
CpG ODN 刺激	6	2.434 ± 0.077 *
CpG ODN 加地塞米松	6	0.894 ± 0.080 ^Δ
CpG ODN 加含药血清	6	1.573 ± 0.042 ^Δ

注:与空白血清组比较,* $P < 0.01$;与 CpG ODN 刺激组比较,^Δ $P < 0.01$

讨 论

SLE 在中医学中类似于“阴阳毒”、“蝴蝶斑”、“日晒疮”、“温毒发斑”等病证,其病因病机为素体禀赋不足、肾精亏损为本,感受外界的热毒之邪、瘀血阻滞为标,虚实互为因果。故本病总以肝肾阴虚为本,以热毒、瘀血为标,这三者又相互联系,互为因果。因此,解毒祛瘀滋肾法是中医治疗 SLE 的基本法则。为此本课题组筛选出“干地黄、炙鳖甲、升麻、七叶一枝花、青蒿、积雪草、赤芍、炒薏苡仁、佛手片、生甘草”10 味中药组成解毒祛祛瘀滋肾方。经临床研究表明,解毒祛瘀滋肾方结合 GC 治疗 SLE,取得了较好的协同作用,与单用 GC 治疗比较,并用解毒祛瘀滋肾方可以减少 GC 的用量提高疗效,起到良好的增效减毒的作用^[2-4]。但其具体的作用机制尚不清楚。

研究表明,异常的固有免疫在 SLE 中发挥了重要的病理作用,尤其是 TLR9 的过表达^[5]。TLR9 通过其下游 MyD88 依赖性及非依赖性信号转导通路来激活各种炎症因子。活化的 Toll 样受体的胞内结构域与 MyD88 羧基端相互作用使其活化,活化的 MyD88 可诱导 IRAKs 激酶磷酸化,进而激活胞浆内的 TRAF-6。活化后的 TRAF-6 通过 TAK1 与 IKK 信号级联,使 I-κB 磷酸化而降解,最终激活 NF-κB。活化后的 NF-κB 由胞浆转移到细胞核内,引起促炎细胞因子基因的转录和表达,启动天然免疫和炎症反应有关基因的转录,诱发各种炎症反应。通过上述信号转导途径,TLR9 介导转录因子的活化,诱导靶基因的转录,介导早期的天然免疫反应。而 MyD88 非依赖性途径主要包括 TRAM 及 TRIF 等主要元件^[6]。

目前,对 TLR9 在抗细菌、抗病毒感染中的作用研究较多,而对其在自身免疫性疾病发病机制中的作用研究较少。有研究发现 TLR9 信号通路的异常活化后,通过促使人类的 pDC 来分泌更高水平的 IFN-α 以及通过激活 B 淋巴细胞来产生更多的自身抗体,从而使 SLE 患者的病情不断发展^[7,8];同时也有研究表明处在活动期的 SLE 患者所表达 TLR9 的 B 细胞比例上升,并且与抗 ds-DNA 抗体的表达具有相关性^[9],这表明在 SLE 中,TLR9 对于抗 DNA 免疫复合物具

有高应答性。有研究证实^[10], TLR9 在人类未分化 B 细胞中的表达非常低, 然而迅速通过 B 细胞受体调节触发 TLR9 表达可以迅速上调, 在记忆 B 细胞中它的表达是高基础水平的。

本实验结果表明, 应用人工合成的去甲基化的 CpG ODN 刺激单核巨噬细胞后, TLR9 及其下游分子 MyD88、NF- κ B 及 IFN- α 表达水平都明显升高, 佐证了 CpG ODN 是 TLR9 的特异性配体的文献记载^[11], 当 CpG ODN 与 TLR9 的特异性结合后, 使该信号通路异常活化, 从而启动天然免疫和炎症反应有关基因的转录, 诱发各种炎症反应, 同时有研究证实 CpG 二核苷酸在 SLE 患者免疫复合物中的频率比在人类基因组中的期望频率高 5 ~ 6 倍^[12]; 研究中运用地塞米松进行干预后, TLR9 的表达水平有一定程度的降低, 但差异无统计学意义, 这与文献记载的 TLR9 在激素抵抗的 SLE 患者中表达异常升高, 并对其在 GC 治疗前后 TLR9 的表达进行统计分析, 发现与其差异无统计学意义相符合, 可见 GC 对 TLR9 的过表达是没有抑制作用的, 这在某种程度上解释了为什么糖皮质激素对激素抵抗的 SLE 患者效果不明显^[13, 14], 也正是中医药联合激素治疗 SLE 的切入点所在, 然而 GC 可以抑制 TLR9 信号通路下游的分子 MyD88、NF- κ B 及 IFN- α 表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 这可能是激素通过抑制其它信号通路以及其自身强大的抗炎免疫抑制作用来实现的; 研究中发现运用解毒祛瘀滋肾方含药血清进行干预后, TLR9 的表达水平明显降低 ($P < 0.01$), 其下游的分子 MyD88、NF- κ B 及 IFN- α 表达水平都有所下降, NF- κ B 的转录活力亦明显下降 ($P < 0.01$), 可以推测解毒祛瘀滋肾方在一定程度上弥补了 GC 对 TLR9 的抑制作用。由此可见, 解毒祛瘀滋肾方能够调控异常活化的 TLR9 信号通路, 从而可以推断解毒祛瘀滋肾方治疗 SLE 起到增效减毒的作用可能是通过调控 TLR9 信号通路来实现的。

参 考 文 献

- [1] 时水治, 李建生, 张志礼. 辨证论治配合金龙胶囊治疗系统性红斑狼疮 33 例临床观察[J]. 北京中医, 2000, (3): 34-35.
- [2] 温成平, 范永升, 李永伟, 等. 中西医结合治疗系统性红斑狼疮的增效减毒作用研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2007, 31(3): 305-309.
- [3] 范永升, 温成平, 李学铭. 解毒祛瘀滋阴药并用激素对 SLE 性激素水平的调节作用[J]. 中国中西医结合肾脏病杂志, 2003, 4(10): 580-582.
- [4] 王新昌, 温成平, 范永升. 解毒祛瘀滋阴法对 SLE 类固

醇性血脂异常的调节作用[J]. 浙江中西医结合杂志, 2003, 13(6): 336-337.

- [5] Barrat FJ, Meeker T, Gregorio JC, et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus[J]. J Exp Med, 2005, 202(8): 1131-1139.
- [6] Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling[J]. J Allergy Clin Immunol, 2006, 117(5): 87979-87988.
- [7] Nakano S, Morimoto S, Suzuki J, et al. Role of pathogenic autoantibody production by Toll-like receptor 9 of B cells in active systemic lupus erythematosus[J]. Rheumatol (Oxf Print), 2008, 47(2): 145-149.
- [8] Vollmer J, Tluk S, Schmitz C, et al. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8[J]. J Exp Med, 2005, 202(11): 1575-1585.
- [9] Papadimitraki ED, Choulaki C, Koutala E, et al. Expansion of Toll-like receptor 9 expressing B cells in active systemic lupus erythematosus: implications for the induction and maintenance of the autoimmune process[J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(11): 3601-3611.
- [10] Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells[J]. Blood, 2003, 101(11): 4500-4504.
- [11] Akira S. Mammalian Toll-like receptors[J]. Curr Opin Immunol, 2003, 15(1): 5-11.
- [12] Sano H, Morimoto C. DNA isolated from DNA/anti-DNA antibody immune complexes in systemic lupus erythematosus is rich in guanine-cytosine content[J]. J Immunol, 1982, 128(3): 1341-1345.
- [13] Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, et al. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma[J]. J Immunol, 1996, 156(7): 2879.
- [14] Sieber J, Daridon C, Fleischer SJ, et al. Active systemic lupus erythematosus is associated with a reduced cytokine production by B cells in response to TLR9 stimulation[J]. Arthritis Res Ther, 2014, 16(6): 477.

(收稿: 2013-11-01 修回: 2014-12-21)