Хулганын макрофаг төст эсэд IFN-Ɣ-аар өдөөгдөгсөн азотын дан ислийн гарцад CpG ODN1826 нөлөөг тодорхойлох

У.Сувд-Эрдэнэ[1], С.Энхтуяа[1], Г.Энхтүшиг[1], Т.Хүсэлт-Од[1], Т.Өлзийхүү[1], С.Оюун[1], Э.Хашчулуун[2], Ч.Онон[2] С.Чимидцэрэн[2], Б.Ариунзаяа[2], Б.Энх-Амар[2], О.Эрдэнэзаяа[6], А.Оюунбаатар[5], Н.Золмөнх[2], Т.Хонгорзул[2], С.Цогтсайхан[2], Л.Энхсайхан[2], Т.Балжиннямм[4], Ч.Гансух[2]

[1]АШУҮИС, Био-Анагаахын Сургууль
[2]АШУҮИС, Био-Анагаахын Сургууль, Дархлаа судлалын тэнхим
[3]АШУҮИС, Био-Анагаахын Хүрээлэн
[4]АШУҮИС, Био-Анагаахын Сургууль, Молекул биологийн тэнхим
[5]АШУҮИС, Био-Анагаахын Сургууль, Бичил-Амь Халдвараас Сэргийлэлтийн тэнхим
[6]АШУҮИС, Био-Анагаахын Сургууль, Анатомийн тэнхим
Цахим шуудан: ptm20d647@st.mnums.edu.mn, Утас: 94953913

Түлхүүр үг:

RAW264.7 эс
INOS уураг
Азотын исэл

Товч утга

Үндэслэл: CpG ODN 1826 нь синтетик аргаар гарган авсан цитозин фосфот гуанинаар баялаг богино, дан утаслаг ДНХ дараалал юм. Зарим судлаачдын судалгаагаар TLR9-н лиганд, CpG ODN нь IFN-Ɣ-аар өдөөгдөх транскрипцийн генүүдийг идэвхжүүлэх ба үүний нөлөөгөөр транскрипцийн нэгж болох iNOS уургийн өдөөлтөөр NO азотын дан исэл)-ийн гарцыг нэмэгдүүлсэн талаар судлагдсан байдаг. **Зорилго:** Raw 264.7 эсэд IFN-Ɣ-аар өдөөгдсөн азотын ислийн гарцад CpG ODN1826 нөлөөг тодорхойлох. **Арга, аргачлал:** Энэхүү судалгааг АШУҮИС-н Био-Анагаахын хүрээлэнгийн эсийн өсгөврийн лаборатори, Био-Анагаахын Сургуулийн Дархлаа судлал тэнхимийн Эмнэлзүйн эмгэг судлалын лабораторийг түшиглэн хийж гүйцэтгэсэн. Туршилтын загвар болгон Raw 264.7 эсийг өсгөвөрлөн 96 well plate рүү нэг нүхэнд 100мкл эзлэхүүнтэй, 10000 эс байхаар тооцон хийж 37ºC; 5%-ийн CO2 инкубаторт 24 цаг инкубаци хийсэн. Туршилтын бүлгүүдэд 1. PBS (сөрөг хяналт) 2. IFN-Ɣ (эерэг хяналт) 3. IFN-Ɣ + ODN1826 тус тус орно. Эмчилгээг 37ºC; 5%-ийн CO2 инкубаторт 24, 48, 72 цагийн турш инкубаци хийж, эсийн өсгөврийн супернатантаас 50 мкл-ыг авч NO-ийн гарцыг Грейссийн аргаар тодорхойлов. **Үр дүн:** Туршилтад Raw 264.7 эсэд 24,48,72 цагуудад азотын ислийн гарц бүх бүлэгт дараалан нэмэгдсэн. 72 цагийн үр дүнг харьцуулан үзэхэд сөрөг хяналттай харьцуулахад бүх бүлэг статистикийн үнэн магадлалтай ялгаатайгаар азотын ислийн гарц ихэссэн байлаа. Харин эерэг хяналт болох IFN-Ɣ өдөөгдсөн бүлэгтэй харьцуулахад ODN1826 нь азотын ислийн гарцыг эрчимжүүлсэн ($p<0.001$). **Дүгнэлт:** ODN1826 CpG нь азотын ислийн гарцыг нэмэгдүүлж байгаа ба iNOS уургийг нийлэгжлийг ихэсгэж байна.

Үндэслэл: CpG ODN нь ДНХ-ийн дараалалд агуулагдах метилжээгүй цитозин, гуаниний динуклеотид арлаар баялаг олигодиоксинуклеотид буюу ДНХ-ийн богино молекулууд юм.[1]

CpG ODN нь төрөлхийн дархлааны хариу урвалыг өдөөдөг төдийгүй Т-туслагч 1 (Th1) хамааралт олдмол дархлааны хариу урвалыг дэмждэг. CpG ODN нь В лимфоцит, сийвэнт эс, сэртэнт эсийн TLR9 рецептортой харилцан үйлчилж, MyD88-аар дамждаг дохионы цуваг эхлүүлдэг.[2] MyD88 дохио дамжилтаар дохио дамжин iNOS (inducible Nitric Oxide Syntitase) уургийг идэвхжүүлж L-arganine, NADPH болон хүчилтөрөгчийн оролцоотойгоор L-citrulline болон азотын ислийг үүсгэдэг.[3]

CpG ODN нь байгалийн алуурчин эсүүд, Т эсүүд, макрофагууд зэрэг бусад төрлийн эсүүдийг шууд бусаар идэвхжүүлдэг. CpG ODN-ээр өдөөгдсөн төрөлхийн дархлааны хариу урвал нь олон төрлийн эмгэг төрүүлэгч бактери, вирус, шимэгч хорхойны эсрэг өрнөдөг. Th1 төрлийн болон үрэвслийн эсрэг цитокинуудын нийлэгжилтийг хөнгөвчлөх, мэргэжлийн антиген илчлэгч эсүүдийн үйл

ажиллагааг дэмжих замаар CpG ODN нь вакцинтай хавсарч хэрэглэхэд эсрэгтөрөгчийн эсрэг өвөрмөц дархлаа үүсэхийг нэмэгдүүлдэг.[4,5] Азотын исэл нь үрэвслийн чухал дохионы молекул бөгөөд мөн макрофагуудаас үүссэн их хэмжээний азотын исэл нь нянгийн хувьд хортой бөгөөд тэдгээрийг устгахад чухал үүрэг гүйцэтгэдэг.[6] IFN-γ болон CpG ODN1826 хавсруулан хэрэглэх үед азотын исэл болон iNOS идэвхжилийг судалсан судалгаа хомс байгаа нь энэхүү судалгааг хийх үндэслэл боллоо.

Зорилго: Raw 264.7 эсэд IFN-γ-аар өдөөгдсөн азотын ислийн гарцад CpG ODN1826 нөлөөг тодорхойлох

Зорилт:

1. Raw 264.7 эсэд IFN-γ-аар өдөөгдсөн NO-ийн гарцад CpG ODN1826 нөлөөг 24, 48, 72 цагийн дараа тодорхойлох
2. Дохио дамжилтын iNOS уургийг тодорхойлох

Арга зүй: Судалгааны ажлыг АШУҮИС-ийн Био-Анагаахын хүрээлэнгийн Эсийн өсгөврийн лаборатори, Био-Анагаахын Сургуулийн Дархлаа судлалын тэнхимийн Эмнэлзүйн Эмгэг судлалын лабораториудыг түшиглэн туршилт судалгааны загвараар хийж гүйцэтгэв. “Харшлын эмчилгээнд CpG DNA хэрэглэн үр дүнг тооцох судалгаа” төсөлт ажлын хүрээнд ёс зүйн зөвшөөрлийг Эрүүл Мэндийн Яамны Анагаах Ухааны Ёс Зүйн Хяналтын хорооны 2021 оны 11-р сарын 09-ны өдрийн хурлаар олгосон.

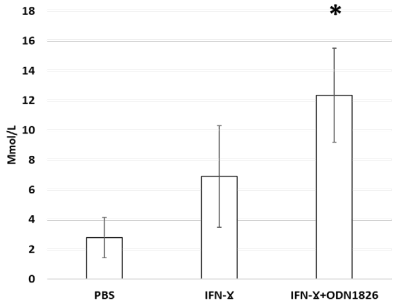
RAW 264.7 эсийн NO-ийн гарцад ODN1826 CpG -ын нөлөөг тодорхойлох Raw 264.7 хулганын макрофаг төст эсийн шугаман өсгөврийг 96 well plate рүү нэг нүхэнд 100мкл эзлэхүүнтэй, 10000 эс байхаар тооцон хийж 37ºC; 5%-ийн CO2 инкубаторт 24 цаг инкубаци хийсэн. Дараа нь RAW 264.7 эсэд 1. 10 мкл PBS (сөрөг хяналт) 2. 10 мкл IFN-γ /1 мкг/мл/ (эерэг хяналт) 3. 10 мкл IFN-γ + 10 мкл ODN1826 /10 мкг/мл/ тус тус нэмж 37ºC; 5%-ийн CO2 инкубаторт 24, 48, 72 цагийн турш инкубаци хийж, эсийн өсгөврийн супернатантаас 50 мкл-ыг авч азотын ислийн гарцыг Грейссийн аргаар тодорхойлов.

iNOS уургийг илрүүлэх аргачлал: Эсээ RIPA lysis buffer ашиглан задалж уургийн концентрацийг Pierce BCA protein assay kit аргаар тодорхойлон , лаймли буфер хийж халаан уургийн гуравдагч , дөрөвдөгч бүтцийг задлан SDS page гель электрофорезоор гүйлгэж уургийн молекул жингээр ялгаж coomassie хөх будгаар будаж харав.

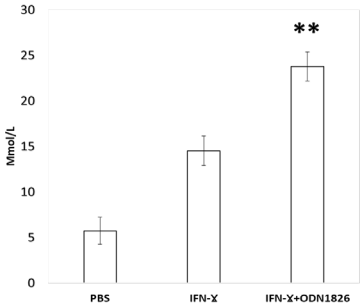
Нийт 3 удаагийн туршилтын дүнг дундаж ± стандарт хазайлт илэрхийлэв. * p<0.05.

Raw 264.7 эсийг PBS, IFN-γ, IFN-γ+ODN 1826 гээр хавсарч үйлчлэхэд 24 цагийн дараа азотын ислийн гарц хяналтын бүлэгт PBS 2.79 ммоль/мл, IFN-γ-аар өдөөгдсөн бүлэгт 6.89 ммоль/мл , IFN-γ болон ODN1826 бүлэгт 12.33 ммоль/мл болж нэмэгдсэн нь статистик үнэн магадлал бүхий ялгаатай гарлаа. (p<0.05) (зураг 2)

Үр дүн: RAW 264.7 эсийн азотын ислийн гарцад ODN1826 CpG -ын нөлөөг тодорхойлсон дүн



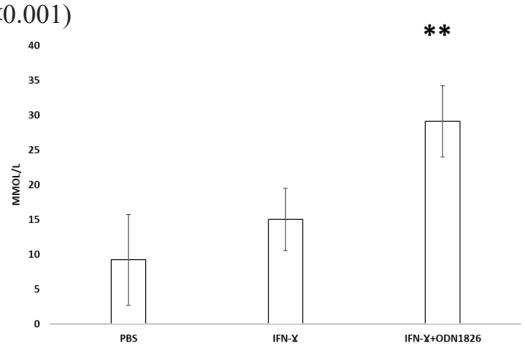
Зураг 1. IFN-γ, IFN-γ+ODN 1826 -аар RAW 264.7 эсийг үйлчилснээс 24 цагийн дараах азотын ислийн гарц.



Зураг 2. IFN-γ, IFN-γ+ODN 1826 -аар RAW 264.7 эсийг үйлчилснээс 48 цагийн дараах азотын ислийн гарц.

Нийт 3 удаагийн туршилтын дүнг дундаж ± стандарт хазайлт илэрхийлэв. * p<0.001.

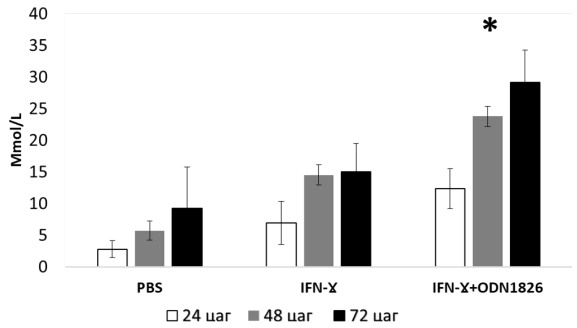
Raw 264.7 эсийг PBS, IFN-γ, IFN-γ+ODN 1826 үйлчлэхэд 48 цагийн дараа азотын ислийн гарц хяналтын бүлэгт PBS 5.71 ммоль/мл, IFN-γ-аар өдөөгдсөн бүлэгт 14.5 ммоль/мл , IFN-γ болон ODN1826 бүлэгт 23.76 ммоль/мл болж нэмэгдсэн нь статистик үнэн магадлал бүхий ялгаатай гарлаа. (p<0.001)



Зураг 3. IFN-γ, IFN-γ+ODN 1826 -аар RAW 264.7 эсийг үйлчилснээс 72 цагийн дараах азотын ислийн гарц.

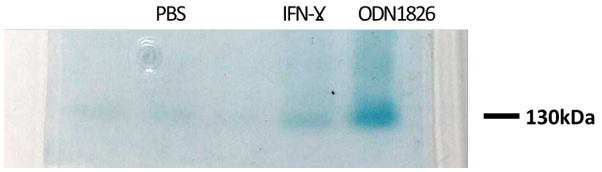
Нийт 3 удаагийн туршилтын дүнг дундаж ± стандарт хазайлт илэрхийлэв. * p<0.001.

Raw 264.7 эсийг PBS, IFN-γ, IFN-γ+ODN 1826 үйлчлэхэд 72 цагийн дараа азотын ислийн гарц хяналтын бүлэгт PBS 9.24 ммоль/мл, IFN-γ-аар өдөөгдсөн бүлэгт 15.04 ммоль/мл , IFN-γ болон ODN1826 үйлчилсэн бүлэгт 29.12 ммоль/мл болж нэмэгдсэн нь статистик үнэн магадлал бүхий ялгаатай гарлаа. (p<0.001)



Зураг 4. IFN-ɣ, IFN-ɣ+ODN 1826 -аар RAW 264.7 эсийг үйлчилснээс 24,48,72 цагийн дараах азотын ислийн гарц. Нийт 3 удаагийн туршилтын дүнг дундаж ± стандарт хазайлт илэрхийлэв. * $p<0.05$.

Туршилтад Raw 264.7 эсэд 24,48,72 цагуудад NO-ийн гарц бүх бүлэгт дараалан нэмэгдсэн. 24,48,72 цагийн үр дүнг харьцуулан үзэхэд эерэг хяналт болох IFN-ɣ өдөөгдсөн бүлэгтэй харьцуулахад ODN1826 нь азотын ислийн гарцыг эрчимжүүлсэн статистикийн үнэн магадлалтай байна. ($p<0.05$).



Зураг 5. SDS page гель электрофорез гүйлгэж coomassie хөх будгаар будсан үр дүн.

1-р багана нь PBS, 2-р багана IFN-ɣ, 3-р багана нь IFN-ɣ болон ODN1826 үйлчилсэн бүлгүүдэд гарсан 130кДА бүхий уураг гүйсэн нь харагдаж байна.

Уургийн фракцыг coomassie хөх будгаар шинжилж үзэхэд iNOS (131 kDa) уургийн молекул жинтэй ойролцоо уураг CpG ODN эмчилгээний дүнд ихсэж байна. Шинжилгээг цаашид Western Blot баталгаажуулах шаардлагатай.

Хэлцэмж: CpG ДНХ болон синтетик CpG ODN аль аль нь дархлааны тогтолцооны сонгодог өдөөгчтэй төстэй үрэвслийн эсрэг цитокинуудыг үүсгэж макрофаг болон бусад эсүүдийг идэвхжүүлж чаддаг нь нотлогдсон. Бактерийн CpG ДНХ нь IFN-ɣ эсвэл LPS-ийн бага тунтай хамт үйлчлэх үед хулганын макрофаг (Raw 264.7) эсэд дархлааны хариу урвалын бүтээгдэхүүн азотын ислийн үйлдвэрлэлийг идэвхжүүлж чаддаггүй байна.[3,7] Utaisincharoen P, нарын судалгаагаар CpG ODN1982, ODN1585, ODN2006 болон CpG-ийн бус бодис E.coli ДНХ 10 мкг/мл хүртэл өндөр концентрацитай хэрэглэж байсан ч мэдэгдэхүйц хэмжээний азотын ислийг үүсгэж чадахгүй байв Харин CpG ODN1826 нь дангаараа хулганын макрофаг эсэд азотын ислийн болон iNOS үйлдвэрлэлийг идэвхжүүлэхэд хангалттай болохыг харуулсан.[3] Hartmann G , Stacey KJ, нарийн судалгаагаар CpG ODN1826 дангаараа NO болон iNOS үйлдвэрлэлийг идэвхжүүлж байсан бол зарим CpG ODN нь дангаараа макрофаг эсээс iNOS болон NO үйлдвэрлэлийг идэвхжүүлж чаддаггүй гэдгийг судалсан байна.[7,8] Хяналтын бүлэгтэй харьцуулахад IFN-ɣ болон ODN1826 CpG үйлчилсэн бүлэг азотын ислийн гарц илүү нэмэгдсэн. ODN1826 нь бусад CpG харьцуулахад азотын ислийн гарцад илүү хүчтэй нөлөө үзүүлдэг.[9] Энэ нь CpG нь нь TLR9-тэй харилцан үйлчилж, улмаар iNOS уургийг идэвхжүүлснээр дархлааны хариу урвалыг сайжруулахад чухал үүрэг гүйцэтгэдэг болохыг харуулж байна. ODN1826-ийн дархлааны хариу урвалд үзүүлэх нөлөөллийн үндсэн механизм дохио дамжилтыг судлахын тулд нэмэлтээр iNOS уургийн идэвхжил судалгаа хийх шаардлагатай байна. iNOS уургийг coomassie будгаар будаж илрүүлсэн ба цаашид Western blot хийхээр төлөвлөж байна.

Дүгнэлт: ODN1826 CpG нь азотын ислийн гарцыг нэмэгдүүлж байгаа ба iNOS уургийг нийлэгжлийг ихэсгэж байна.

Ном зүй:

1. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature. 2000;408(6813):740-745.

2. Krieg AM, Yi AK, Hartmann G. Mechanisms and therapeutic applications of immune stimulatory cpG DNA. Pharmacology & therapeutics. 1999;84(2):113-120.

3. Utaisincharoen P, Anuntagool N, Chaisuriya P, Pichyangkul S, Sirisinha S. CpG ODN activates NO and iNOS production in mouse macrophage cell line (RAW 264.7). Clinical and experimental immunology. 2002;128(3):467-473.

4. 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. Developmental and comparative immunology. 2003;27(6-7):621-627.

5. He H, Kogut MH. CpG-ODN-induced nitric oxide production is mediated through clathrin-dependent endocytosis, endosomal maturation, and activation of PKC, MEK1/2 and p38 MAPK, and NF-kappaB pathways in avian macrophage cells (HD11). Cell Signal. 2003;15(10):911-917.

6. Luiking YC, Engelen MP, Deutz NE. Regulation of nitric oxide production in health and disease. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care. 2010;13(1):97-104.

7. Stacey KJ, Sweet MJ, Hume DA. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 1996;157(5):2116-2122.

8. Hartmann G, Weeratna RD, Ballas ZK, et al. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2000;164(3):1617-1624.

9. Cheng T, Miao J, Kai D, Zhang H. Polyethylenimine-Mediated CpG Oligodeoxynucleotide Delivery Stimulates Bifurcated Cytokine Induction. ACS biomaterials science & engineering. 2018;4(3):1013-1018.

Determination of the effect of CpG ODN1826 on IFN-Ɣ stimulated nitric oxide production in Raw 264.7 cell

Suvd-Erdene U[1] , Enkhtuya S[1], Enkhtushig G[1], Khuselt-Od T[1], Ulziikhuu T[1], Oyun S[1], Khaschuluun E[2], Onon Ch[2], Chimidtseren S[2], Ariunzaya B[2], Enkh-Amar B[2], Erdenezaya O[6], Oyunbaatar A[5], Zolmunkh N[2], Khongorzul T[2],Tsogtsaikhan S[2], Enkhsaikhan L[2], Baljinnyam T[4], Gansukh Ch[2]

[1]*School of Biomedicine, MNUMS*
[2]*Department of Immunology, School of Biomedicine, MNUMS*
[3]*Institute of Bio-Medical Sciences MNUMS*
[4]*Department of Molecular Biology and Genetics, School of Biomedicine, MNUMS*
[5]*Department of Microbiology and Infection Control, School of Biomedicine, MNUMS*
[6] *Department of Anatomy, School of Biomedicine, MNUMS*
E-mail: pmm20d647@st.mnums.edu.mn, Tel:+976-94953913

Bacground: ODN 1826 CpG is a synthetically derived cytosine phosphoguanine-rich short single-stranded DNA sequence. According to some researchers, the ligand of TLR9, CpG DNA, activates the transcriptional genes induced by IFN-Ɣ, and as a result, the output of NO (nitric oxide) is increased by the stimulation of the transcription unit iNOS protein.

Aim: Determination of the effect of ODN1826 CpG on IFN-Ɣ-stimulated NO production in Raw 264.7 cells

Materials and methods: This study was carried out with the support of the Cell Culture Laboratory of the Institute of Bio-Medical Sciences of MNUMS, and the Clinical Pathology Laboratory of the Department of Immunology of Bio-Medical School. Raw 264.7 cells were cultured in a 96 well plate with a volume of 100 µl and 10,000 cells per well for 24 hours at 37ºC; 0.5% CO2 incubator. Experimental groups include 1. PBS (negative control) 2. IFN-Ɣ (positive control) 3. IFN-Ɣ + ODN1826. Incubation with treatment substances at 37ºC; 0.5% CO2 incubator for 24, 48, and 72 hours, 50 µl of the cell culture supernatant was taken and NO yield was the determined by Greiss method. The cells were lysed using RIPA lysis buffer, and the protein concentration was determined using the BCA method. SDS gel electrophoresis was performed to separate protein molecular weights, and the gel was stained with Coomassie Blue dye.

Results: In the experiment, the nitric oxide (NO) output in RAW cells at 24, 48, and 72 hours increased consecutively in all groups. When comparing the results at 72 hours, all groups exhibited statistically significant increases in Nitric Oxide output compared to the negative control. In comparison with the positive control and the IFN-Ɣ induced group, ODN1826 significantly enhanced nitric oxide production ($p < 0.001$). The protein was run on an SDS gel and stained with Coomassie Blue, revealing the iNOS protein.

Conclusion: ODN1826 CpG increases nitric oxide production and induces iNOS protein synthesis.

Keywords: Raw 264.7 cell, iNOS protein, Nitric Oxide