

# 评价空肠弯曲菌外膜蛋白 PEB1 介导的重组 BCG 与上皮细胞的结合能力\*

胡琳洁<sup>1</sup> 郭晓雅<sup>1</sup> 侯美娜<sup>1</sup> 邵 成<sup>2</sup> 史皆然<sup>1△</sup>

(1 第四军医大学西京医院呼吸内科 陕西 西安 710032 2 中国人民解放军二六六医院呼吸内科 北京 100094)

**摘要 目的:**评价 PEB1 介导的屋尘螨抗原 (Der p2) 重组 BCG 疫苗 (PEB1-Der p2- rBCG) 与人上皮细胞的结合能力。**方法** 采用体外细胞培养的方法,分别将普通 BCG、胞壁型 Der p2-rBCG 和胞壁型融合蛋白 PEB1-Der p2- rBCG 与 HeLa 细胞及人类肠粘膜上皮细胞 (HIEC) 进行共孵育,利用 HE 和抗酸染色法对各组细胞与疫苗的黏附结果进行染色,光学显微镜下计数各组的黏附率,并进行比较,对以上各组分别加入 PEB1 蛋白,进行黏附阻断,观察对结合能力的影响。**结果** 孵育 24 小时后,无论 HeLa 细胞还是 HIEC PEB1-Der p2- rBCG 组较普通 BCG 组和 Der p2-rBCG 组的黏附率明显提高,差异有显著性 ( $P<0.05$ )。PEB1 蛋白的加入对 PEB1-Der p2- rBCG 的黏附功能有明显抑制作用 ( $P<0.05$ ) ;但是,Der p2 -rBCG 组与普通 BCG 组比较没有明显差异 ( $P>0.05$ ) , PEB1 蛋白的加入对二者的黏附亦无影响 ( $P>0.05$ ) 。**结论** PEB1 具有介导增强 PEB1-Der p2- rBCG 与上皮细胞黏附的能力。

**关键词** 重组 BCG 细胞黏附 HeLa 细胞 HIEC

**中图分类号** Q75 Q78 Q813 R974 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 10-1810-03

## Evaluation of Combination Ability Between Recombinant BCG Mediated by Membrane Protein PEB1 of C.Jejuni and Epithelium Cells\*

HU Lin-jie<sup>1</sup>, GUO Xiao-ya<sup>1</sup>, HOU Mei-na<sup>1</sup>, SHAO Cheng<sup>2</sup>, SHI Jie-ran<sup>1△</sup>

(1 Respiratory Medicine Department of Xijing Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China ;

2 Department of pneumology; The Chinese people's liberation army 261 hospital.Beijing; 100094 ,China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the combination ability of the PEB1-Der p2- rBCG and epithelium cells. **Methods:** The method of cell culture in vitro was used to culture the bacterial strains of common BCG,membrane form Der p2-rBCG and membrane form PEB1-Der p2- rBCG with HeLa and human intestinal epithelial cells (HIEC),HE staining and acid-fast staining were used and the adhesion of cells was detected at light microscopy; purified PEB1was added into each group to adhesion blocking,and the influence of combining ability was observed. **Results:** After incubated for 24 h,no matter HeLa cells or HIEC,adhesion rate of PEB1-Der p2- rBCG was obviously improved than common BCG and Der p2-rBCG, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ); The differences between PEB1-Der p2- rBCG performed in the absence and presence of PEB1 protein were significant ( $P < 0.05$ ); However, the Der p2-rBCG bacteria group was not significantly different from common BCG group ( $P > 0.05$ ) and no adhesion blocking effects in the two group which added PEB1 protein ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** The PEB1 increased the adhesion ability which mediated PEB1- Der p2 - rBCG and epithelium cells.

**Key words:** Recombinant BCG; Adherence; HeLa cell; HIEC

**Chinese Library Classification(CLC):** Q75 Q78 Q813 R974 **Document code:** A

**Article ID:**1673-6273 (2011) 10-1810-03

### 前言

人类历史上,曾经出现过多种造成巨大生命和财产损失的疫症,在预防和消除这些疫症的过程中,疫苗发挥十分关键的作用。实际生活中应用最广泛的是传统灭活疫苗、减毒活疫苗和基因工程,但少部分存在着免疫效果不确实、非特异性反应强、安全隐患等缺点<sup>[1-2]</sup>,这就使得新型疫苗 (特别是基因重组疫苗) 的出现成为必然。基因重组卡介苗 (Gene recombinant Bacillus Calmette-Guerin vaccine, rBCG) 是借助基因工程技术对 BCG 基因进行改造,并利用 BCG 的活疫苗特性,构成一次免

疫能产生对多种疾病持久防御的基因工程疫苗。构建 rBCG 的最终目的是提高其免疫原性,使其能同时诱导对多种疾病的持久免疫,以预防和治疗疾病<sup>[3]</sup>。研究表明,许多实验室制备了携带不同抗原的重组 BCG,将其用于多种疾病(如肿瘤、细菌、病毒和寄生虫感染等)的防治,取得了可喜的结果<sup>[4-8]</sup>。众所周知,哮喘是一种过敏性疾病,近十年来人们正尝试探索用疫苗来治疗该病。本研究小组<sup>[9-10]</sup>前期已成功创建胞壁型 Der p2-rBCG 和胞壁型 PEB1-Der p2-rBCG。在此研究的基础上,我们采用体外细胞培养的方法,评价疫苗 PEB1-Der p2-rBCG 与上皮细胞 (HeLa 细胞和 HIEC) 的结合能力。

\* 基金项目 国家自然科学基金资助 (30871114)

作者简介 胡琳洁 (1984) ,女,医学硕士,主要从事哮喘的发病机制与防治的研究,E-mail:yuhengqingzuo2009@163.com

△通讯作者 史皆然,男,硕士生导师,副教授,E-mail:sjr1966@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2011-01-07 接受日期 2011-01-30)

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 胞壁型 Der p2-rBCG、胞壁型 PEB1-Der p2-rBCG 均由本实验小组构建<sup>[9-10]</sup>；BCG 菌株 D2-PB302S 甲 10 株 (Pasteur 1173 属) 由第四军医大学动物中心提供。

1.1.2 细胞株 人宫颈癌细胞株 HeLa 由第四军医大学动物中心馈赠；正常人肠上皮细胞株 HIEC 由第四军医大学消化病医院馈赠。

1.1.3 主要试剂与仪器 胎牛血清购自北京元亨金马生物技术开发有限公司；RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司；胰蛋白酶、伊红 Y 二钠盐购自科昊生物工程有限责任公司；胰岛素注射液购自安徽宏业药业有限公司；纯化的 PEB1 蛋白由西京医院呼吸内科简文博士馈赠；结核菌染色液购自珠海贝索生物技术有限公司；苏木精染色液购自北京鼎国茂盛生物技术有限公司；显微镜购于日本 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌的制备 分别接种 BCG、胞壁型 Der p2-rBCG 和胞壁型 PEB1-Der p2-rBCG 于 200 mL 7H9(含 ADC)于 37℃ 培养至 A<sub>600</sub>=1.2，经平皿菌落计数法确定细菌浓度约为 10<sup>9</sup> CFU/mL。各取 10 mL 培养物，8 000 r/min 离心 10 min，收集细菌，用 D-Hank's 液离心洗涤 3 次，分别加 10% 小牛血清 RPMI-1640 培养液制备细菌悬液。

1.2.2 细胞培养 HeLa 细胞株采用含 10% 小牛血清 RPMI-1640 培养液(含 100 mg/L 青霉素和链霉素)培养，HIEC 细胞株用含 10% 小牛血清 RPMI-1640 培养液(含 100 mg/L 青霉素和链霉素以及 0.625% 的注射用胰岛素)培养，两种细胞株都置于 37℃，5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱内培养，正常贴壁生长后以 0.1% 胰酶消化制成细胞悬液，按每孔 1×10<sup>5</sup>/mL 接种于已放入盖玻片的六孔板中培养，待细胞贴壁并汇合至 30% 时，开始进行细菌黏附及抑制试验。

1.2.3 黏附试验 于六孔板中分别加入已制备好的 BCG 细菌悬液、Der p2-rBCG 细菌悬液、PEB1-Der p2-rBCG 细菌悬液，每组设 4 个复孔。分别于培养 6、12、18、24 h 后，每组各取出 1 张盖玻片，以 PBS 洗涤 3 次，95% 酒精固定后，依次用 HE 和抗酸染色法进行染色，光学显微镜下观察结果(油镜，放大 100 倍)。每孔的盖玻片随机计数 100 个细胞，根据公式计算黏附率。黏附实验相关步骤重复 3 次<sup>[11]</sup>。

细菌黏附率=(黏菌细胞数/100 个上皮细胞)×100%

1.2.4 抑制试验 于六孔板的每孔中都预先加入 25 μg/mL 的 PEB1 蛋白后，再分别加入已制备好的 BCG 细菌悬液、Der p2-rBCG 细菌悬液、PEB1-Der p2-rBCG 细菌悬液，每组设 4 个复孔。其余实验步骤同黏附实验，计算各组的黏附率。抑制实验相关步骤也重复 3 次。

1.2.5 统计分析 采用 SPSS13.0 统计软件，对实验数据进行统计分析，依不同 BCG 菌分组进行方差分析和 t 检验，结果以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示，P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 黏附试验

结果显示，无论 BCG 还是 rBCG，对 HeLa 细胞和 HIEC 的

黏附率与二者相互作用的时间有关，即黏附率随着作用时间的延长而增大(图 1)。各 BCG 组与 HeLa 细胞以及 HIEC 作用 24 h 后，其黏附率达到高峰，其中，PEB1-Der p2-rBCG 组与 HeLa 细胞和 HIEC 的黏附率分别为 100% 和 68.6%，再延长疫苗与细胞作用的时间，其黏附率无明显变化，故将作用时间为 24 h 作为黏附率评价的时间点。如图 2 所示为不同的 BCG 组对上皮细胞的黏附率，可见 PEB1-Der p2-rBCG 组与普通 BCG 组以及 Der p2-rBCG 组比较差异有显著性(P<0.05)。

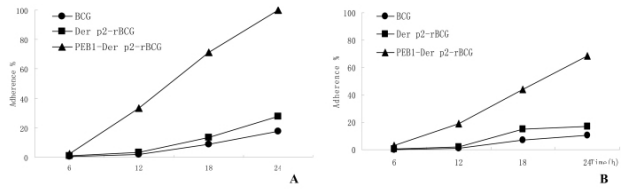


图 1 不同的孵育时间疫苗与细胞黏附的效率 A) 与 HeLa 细胞的黏附率 B) 与 HIEC 细胞的黏附率

Fig. 1 Adherence of bacteria to cells at different times: A) the adhesion to HeLa cells; B) the adhesion to HIEC cells

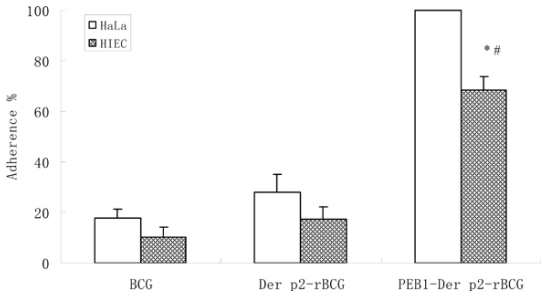


图 2 不同 BCG 与上皮细胞作用 24 h 的黏附率比较

\*P<0.05, 与普通 BCG 组比较；# P<0.05, 与 Der p2-rBCG 组比较

Fig. 2 Comparison of adhesion rate of the different BCG on epithelial cells for 24 hours

\*P<0.05 compared to BCG group # P<0.05 compared to Der p2-rBCG group

2.2 抑制实验

如图 3 所示，将 PEB1 蛋白加入疫苗与上皮细胞的孵育系统，作用 24 小时后，发现与未加 PEB1 时相比，普通 BCG 组与 HeLa 细胞和 HIEC 的黏附率未受影响(各组间 P>0.05)，Der p2-rBCG 组与上皮细胞的黏附率亦未受影响(各组间 P>0.05)(数据未显示)；而 PEB1 蛋白的加入对 PEB1-Der p2-rBCG 组与 HeLa 细胞和 HIEC 的黏附率却有显著差异(各组间 P<0.05)(图 4)。

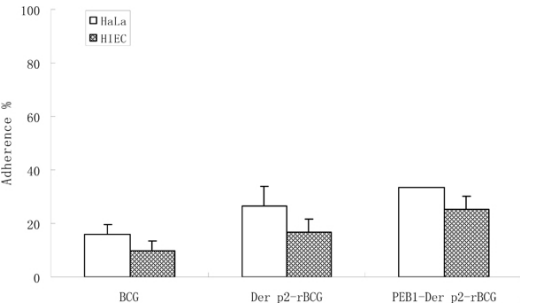


图 3 PEB1 对不同 BCG 与上皮细胞黏附的影响

Fig. 3 Effects of PEB1 on adhesion of different BCG to epithelial cells

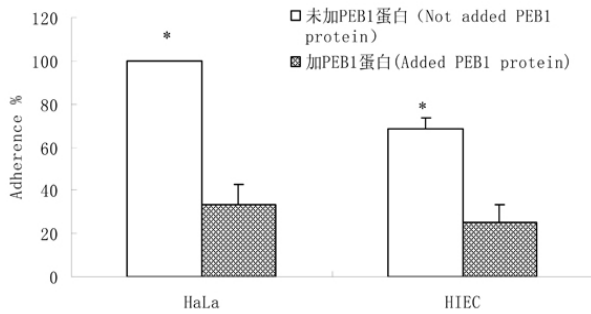


图4 PEB1对PEB1-Derp2-rBCG与上皮细胞黏附的影响

\* $P < 0.05$ , 与加入PEB1蛋白的PEB1-Derp2-rBCG组比较

Fig. 4 Effects of PEB1 on adhesion of PEB1-Derp2-rBCG to epithelial cells

\* $P < 0.05$  compared to PEB1-Derp2-rBCG group in the presence of PEB1 protein

### 3 讨论

疫苗发挥免疫调节作用取决于其与免疫系统作用的强度。BCG疫苗传统的使用方法是采用注射接种。以BCG作为载体制备的rBCG虽可用于多种疾病的防治,但容易引起局部严重的迟发型超敏反应(DTH),因而影响了注射接种的可重复性和疗效。研究表明,rBCG经消化道接种诱导了局部和全身抗原特异性细胞免疫应答,具有对结核<sup>[12]</sup>和人类免疫缺陷病毒(HIV)<sup>[13]</sup>感染的防治作用。因此,本研究制备了口服免疫的肠道疫苗,用于哮喘的防治研究。疫苗口服后,首先与肠道粘膜上皮发生作用,肠道上皮中的很多细胞参与了这一过程<sup>[14-16]</sup>。其中,位于淋巴滤泡上皮中的特化的粘膜上皮细胞——微皱褶细胞(M细胞)是大多数粘膜病原体侵入机体的靶细胞。在肠道,M细胞主要承担着向黏膜下转运肠腔内抗原的职责,进而诱发免疫应答的功能。作为肠道黏膜免疫屏障的门户,M细胞被认为是肠黏膜免疫屏障中重要的功能性通道<sup>[17]</sup>。

黏附是很多细菌致病的首要条件,也是刺激免疫的重要环节。为了评价本小组前期所创建的胞壁型PEB1-Derp2-rBCG与上皮细胞的结合能力,本研究采用体外细胞培养的方法,观察比较了不同的BCG与HeLa细胞以及HIEC的黏附率,结果发现胞壁型PEB1-Derp2-rBCG对HeLa细胞和HIEC具有更高的黏附能力( $P < 0.05$ ),加入纯化的PEB1蛋白后,该黏附能力被抑制( $P < 0.05$ ),说明融合表达在BCG胞壁外的PEB1有效地介导了rBCG与上皮细胞的结合,从而提高了PEB1-Derp2-rBCG与上皮细胞的黏附能力。

在研究发现普通BCG和Derp2-rBCG与HeLa细胞和HIEC也具有一定程度的黏附,我们考虑这是非特异性的黏附,与细胞表面的Toll样受体(Toll-like receptor,TLRs)有关。TLRs是一种模式识别受体,可以识别病原微生物的胞内胞壁成分。研究发现,正常人体的肠道粘膜上皮细胞在其基底侧面表达少量的TLR3和TLR5,肠腔面表达少量的TLR2和TLR4<sup>[18]</sup>。TLR2可以识别脂蛋白和糖脂,脂蛋白是BCG表面的主要成分,所以可以介导其与上皮细胞的黏附,这也是结核分枝杆菌刺激肠道免疫应答的一个可能的机制。Mukai T等在利用rBCG调节麻风分枝杆菌免疫中观察到表达Hsp70-MMP-II的

rBCG通过TLR2启动了与抗原递呈细胞的相互作用<sup>[19]</sup>。

先前的研究<sup>[20]</sup>和现阶段的实验都观察到无论是普通BCG还是rBCG口服都能得到较为理想的免疫刺激作用,这多考虑是通过上述机制诱发的。本研究用PEB1对胞壁型rBCG进行改造,使其与肠道粘膜上皮具有更高的黏附作用,以便更有效地刺激免疫应答,这为今后将rBCG疫苗用于哮喘治疗研究奠定了重要基础。

### 参考文献 (References)

- [1] 张艳,魏海涛,陈元鼎. 轮状病毒疫苗的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(7): 768-789  
ZHANG Yan, WEI Hai-tao, CHEN Yuan-ding. Progress in Research on Rotavirus Vaccine[J]. Chin J Biologicals, 2010, 23(7): 768-789
- [2] 刘东涌, 罗恩杰. 中国间日疟疾疫苗的发展现状与展望[J]. 日本医学介绍, 2004, 25(2): 89-91  
LIU Dong-yong, LUO En-jie. The present development situation and prospect of the China Tertian malaria vaccine [J]. Progress in Japanese medicine, 2004, 25(2): 89-91
- [3] 李瑾, 黄炳成. 基因重组卡介苗研究进展[J]. 中国热带医学, 2009, 9(1): 160-162  
LI Jin, HUANG Bing-cheng. Recent advances in gene recombinant Bacillus Calmette-Guerin Vaccine[J]. China tropical medicine, 2009, 9(1): 160-162
- [4] Thomas WR, Smith W, Hales B. Recombinant allergens for immunotherapy [J]. ACI international, 2000, 12(5): 222-225
- [5] Yamada H, Matsumoto S, Matstanoto T, et al. Prostaglandin downregulates viable Bacille Calmette-Guerin-induced macrophage cytotoxicity against murine bladder cancer cell MBT-2 in vitro [J]. Clin Exp Immunol, 2002, 128(1): 52-58
- [6] Dhar N, Rao V, Tyagi AK. Immunogenicity of recombinant BCG vaccine strains overexpressing components of the antigen 85 complex of Mycobacterium tuberculosis [J]. Med Microbiol Immunol, 2004, 193(1): 19-25
- [7] Kanekiyo M, Matsuo K, Hamatake M, et al. Mycobacterial codon optimization enhances antigen expression and virus-specific immune-responses in recombinant Mycobacterium bovis bacille Calmette-Gu-erin expressing human immunodeficiency virus type 1 Gag[J]. J Virol, 2005, 79(14): 8716-8723
- [8] Ivan P. Nascimento, Waldely O. Dias, Wagner Quintilioni, et al. Construction of an unmarked recombinant BCG expressing a pertussis antigen by auxotrophic complementation: Protection against Bordetella pertussis challenge in neonates[J]. Vaccine, 2009, 27: 7346-7351
- [9] 史皆然, 李元, 戚好文, 等. Derp2重组胞壁型E.coli-BCG穿梭表达载体的构建和鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2003, 19(2): 132-135  
SHI Jie-ran, LI Yuan, QI Hao-wen, et al. Construction and identification of the E.coli-BCG shuttle vector expressing lipoprotein Derp2 on cell wall of mycobacterium vaccae[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2003, 19(2): 132-135
- [10] 邵成, 史皆然, 郭晓雅, 等. 胞壁形式表达融合蛋白Derp2-PEB1重组BCG[J]. 科学技术与工程, 2010, 10(17): 4135-4138  
SHAO Chen, SHI Jie-ran, GUO Xiao-ya, et al. Construction and Expression of the Recombinant BCG Expressing Derp2-PEB1 Fusion Protein in Form of Lipoprotein[J]. Science Technology and Engineering, 2010, 10(17): 4135-4138

(下转第1820页)



抑作用减弱,SREBP-1c 启动子的活性增强,导致 SREBP-1c 的表达上调,激活脂肪酸合成途径中多种基因转录子,启动合成程序,从而使肝脏脂质尤其是甘油三酯含量增加<sup>[12]</sup>。本实验中 NAFLD 组大鼠肝脏 SOCS-3 和 SREBP-1c 的 mRNA 表达为均较正常对照组增加,且两者之间呈显著正相关。

由于 SOCS-3 参与了多种激素或大分子引起的胰岛素抵抗及 NAFLD 的形成过程,我们可以推测 SOCS-3 作为靶分子在 NAFLD 治疗中具有一定的应用前景。吡格列酮是噻唑烷二酮类口服降糖药,为高选择性的过氧化物酶体增殖物激活受体- $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , PPAR- $\gamma$ ) 的激动剂,通过提高胰岛素敏感性而控制血糖水平。而随着研究的深入,人们发现吡格列酮除降糖外还具有抑制肝组织 SOCS-3 表达和抗炎性细胞浸润的作用<sup>[15]</sup>。因此,本实验以吡格列酮为干预药物,对 NAFLD 大鼠进行干预。与 NAFLD 对照组相比,吡格列酮干预组的大鼠肝脏 SOCS-3 mRNA 和 SREBP-1c mRNA 的表达均下调,并且血糖、胰岛素抵抗指数、血脂、肝脏脂肪变程度也显著下降。这提示吡格列酮可能是通过抑制 SOCS-3 mRNA 的表达,改善胰岛素抵抗,并且降低 SREBP-1c 启动子的活性,减少脂肪酸和甘油三酯的生成,从而对 NAFLD 具有治疗作用,但吡格列酮抑制 SOCS-3 表达的作用机制尚不明确,仍有待深入探讨。

目前国内外关于 SOCS-3 与 NAFLD 之间的关系以及作用机制的研究报道甚少,将此研究进一步完善和深入,将为 NAFLD 的临床研究和药物开发提供一个新的方向。

#### 参考文献(References)

- [1] BrunT EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Word J Gastroenterol, 2010, 16(42): 5286-5296
- [2] Erickson, SK. Nonalcoholic fatty liver disease [J]. J Lipid Res, 2009, 50(Supplement): S412- S416
- [3] Krawczyk M, Bonfrate L, Portincasa P.. Nonalcoholic fatty liver disease[J]. Best Pract Res Clin, 2010, 24(5): 695-708
- [4] Bloomgarden ZT. Second World Congress on the insulin resistance syndrome: insulin resistance syndrome and fatty liver disease [J].

Diabetes Care, 2005, 28: 1518-1523

- [5] Ueki K, Tatsuya kondo, Tseng YH, et al. Centrol role of suppressor of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the mouse [J]. PNAS, 2004, 101 (28): 10422-10427
- [6] 范建高, 钟岚, 王国良等. 胰岛素抵抗在高脂饮食大鼠非酒精性脂肪肝发病中的作用[J]. 胃肠病学, 2000, 3: 169-170  
Fan Jian-gao, Zhong Lan, Wang Guo-liang, et al. Insulin Resistance in the Pathogenesis of Non-alcoholic Steatohepatitis in Rats Induced by High Fat Diet[J]. Gastroenterology, 2000, 3:169-170
- [7] Samuel VT, Liu ZX, Qu X, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Biol Chem, 2004, 279:32345-32353
- [8] Leonard WJ. Role of JAK kinase and STATs in cytokine signal transduction [J]. INT J Hematl, 2001, 73(3): 271-277
- [9] Lebrun P, Van Obberghen E . SOCS proteins causing trouble in insulin action[J]. Acta Physiol (Oxf), 2008, 192(1): 29-36
- [10] Farrell GC. Signalling links in the liver: knitting SOCS with fat and inflammation[J]. J Hepatol, 2005 Jul; 43(1): 193-196
- [11] Kievit P, Howard JK, Badman MK, et al. Enhanced leptin sensitivity and improved glucose homeostasis in mice lacking suppressor of cytokine signaling-3 in POMC-expressing cells [J]. Cell Metab, 2006, 2: 123-132
- [12] Ueki K, Kadowaki T, Kahn CR.. Role of suppressors of cytokine signaling SOCS-1 and SOCS-3 in hepatic steatosis and the metabolic syndrome[J]. Hepatol Res, 2005, 33(2):185-192
- [13] Shimano, H. SREBPs: physiology and pathophysiology of the SREBP family[J]. FEBS J, 2009, 276:616-621
- [14] Ahmed, M H.; Byrne, C. D. Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease[J]. Drug Discovery Today, 2007, 12: 740-774
- [15] Massimo Collino, Manuela Aragno, Sara Castiglia, et al. Pioglitazone improves lipid and insulin levels in overweight rats on a high cholesterol and fructose diet by decreasing hepatic inflammation[J]. British Journal of Pharmacology, 2010, 160: 1892-1902

#### (上接第 1812 页)

- [11] Mrudula P, Zandiswa G, Mike D. The effect of Dodonaea viscosa var. angustifolia on Candida albicans proteinase and phospholipase production and adherence to oral epithelial cells[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 124(3): 562-565
- [12] Aldwell FE, Tucker IG, De Lisle GW, et al. Oral delivery of Mycobacterium bovis BCG in a lipid formulation induces resistance to pulmonary tuberculosis in mice[J]. Infect Immun, 2003, 71(1): 101-108
- [13] Kawahara M, Hashimoto A, Toida I, et al. Oral recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin expressing HIV-1 antigens as a freeze-dried vaccine induces long-term, HIV-specific mucosal and systemic immunity[J]. Clin Immunol, 2002, 105(3): 326-331
- [14] Kelsall BL. Innate and adaptive mechanisms to control pathological inflammation[J]. J Pathol, 2008, 214(2):242-259
- [15] Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria[J]. Nature Immunol, 2001, 2(4):361-367
- [16] Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in im-

munity[J]. Nat Immunol, 2004, 5(12):1219-1226

- [17] 平晓春, 李幼生. 淋巴小结相关上皮细胞在肠粘膜屏障中的作用[J]. 肠外与肠内营养, 2008, 15(2):110-122  
PING Xiao-chun, LI You-sheng. Role of microfold cell in intestinal barrier function[J]. Parenteral & Enteral Nutrition, 2008, 15(2):110-122
- [18] Fukata M, Abreu MT. TLR4 signalling in the intestine in health and disease[J]. Biochem Soc Trans, 2007, 35(Pt 6):1473-1478
- [19] Mukai T, Maeda Y, Tamura T, et al. Induction of cross-priming of naive CD8<sup>+</sup> T lymphocytes by recombinant bacillus Calmette-Guerin that secretes heat shock protein 70-major membrane protein- II fusion protein[J]. J Immunol, 2009, 183(10):6561-6568
- [20] 史皆然, 张新海, 师长宏, 等. 胞壁表达 Der p2 的重组 BCG 对 BALB/c 小鼠 Th 细胞免疫应答的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21(3):287-289  
SHI Jie-ran, ZHANG Xin-hai, SHI Chang-hong, et al. The effects of rBCG expressing Der p2 in the form of lipoprotein on murine immune response[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2005, 21(3):287-289