|  |  |
| --- | --- |
| 学校代码： | 10264 |
| 研究生学号： | M100104204 |

**上 海 海 洋 大 学**

**硕 士 学 位 论 文**

|  |  |
| --- | --- |
| **题** **目：** | 大肠杆菌不耐热肠毒素诱导小鼠细胞因子变化规律研  究 |
| **英文题目：** | E. coli heat-labile enterotoxin- induced cytokine  production in mice |
| **专** 业： | 临床兽医学 |
| **研究方向：** | 病毒与分子Th物学 |
| **姓** 名： | 董端凝 |
| **指导教师：** | 刘惠莉 研究员 |

二 O 一三年四月

**上海海洋大学学位论文原创性声明**

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

日期： 年 月 日

**上海海洋大学学位论文版权使用授权书**

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定， 同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权上海海洋大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于

保密 □ ，在 年解密后适用本版权书。 不保密 ■

学位论文作者签名： 指导教师签名：

日期： 年 月 日 日期： 年 月 日

**上海海洋大学 硕士学位论文**

**答辩委员会成员名单**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 姓名 | 工作单位 | 职称 | 备注 |
| 李佳乐 | 上海海洋大学 | 教授 | 主席 |
| 蒋杰贤 | 上海市农业科学院 | 研究员 | 委员 |
| 宋祥甫 | 上海市农业科学院 | 研究员 | 委员 |
| 易建中 | 上海市农业科学院 | 研究员 | 委员 |
| 张德福 | 上海市农业科学院 | 研究员 | 委员 |
| 王梅玉 | 上海市农业科学院 | 助研 | 秘书 |
| 答辩地点 | 上海市农业科学院机关楼二楼第四  会议室 | 答辩日期 | 2013 年 5  月 24 日 |

大肠杆菌不耐热肠毒素诱导小鼠细胞因子变化规律研究

摘要

大肠杆菌不耐热肠毒素（LT）是产肠毒素性大肠杆菌（ETEC）产生的一种能导致人或幼畜肠炎和腹泻的毒性因子。是目前最强有力的粘膜免疫原和粘膜免疫佐剂之一，具有较强的免疫调节作用，可以刺激机体产生多种细胞因子。但由于其本身具有很强的肠毒性不宜直接使用，因此人们构建了许多无毒或减毒突变体，其中双突变体LTRG毒性比野生型LT低很多。本实验利用大肠杆菌表达的重组LT蛋白免疫小鼠或刺激小鼠巨噬细胞，采用建立的荧光定量PCR方法分析了LT黏膜佐剂对小鼠体内、及刺激细胞内的6种细胞因子IL-1β、IL-12、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-6动态变化。同时采用液相芯片技术及流式细胞技术，分析了LT蛋白作用下巨噬细胞内这6种细胞因子的表达及T淋巴细胞的变化。

不同剂量的LTRG蛋白作用体外培养的小鼠巨噬细胞，结果1ug/ml 的LTRG

蛋白对巨噬细胞的刺激效果最明显，对IL-1β和IL-4细胞因子变化最显著。检测

LT蛋白处理的小鼠巨噬细胞中细胞因子的mRNA表达量变化，结果显示野生型

LT组IL-1β、TNF-α和IL-6的mRNA表达量分别在免疫后2h、4h和12h达到峰值，与对照组差异极显著（p＜0.01）；IL-12、IFN-γ、IL-4的mRNA表达量在免疫后24h达到最大值，与对照组差异极显著（p＜0.01）。PBS对照组细胞因子无显著变化。突变型LTRG组细胞因子mRNA的表达量在免疫后达到峰值的时间与野生型LT组相比有不同程度的延迟。

为了进一步了解LTRG蛋白对共免疫原的作用，采用LTRG与BSA共免疫小鼠巨噬细胞，结果显示LTRG和BSA协同处理后大多数细胞因子的mRNA表达量在12h达到高峰，与单独使用BSA组差异极显著（p＜0.01）；TNF-α和IL-6 的

mRNA表达量分别在免疫后8h和24h达到峰值，与BSA组差异极显著（p＜0.01）。

BSA对照组细胞因子无显著变化。通过液相芯片技术分析LT对巨噬细胞中细胞因子的影响，由于细胞上清液中蛋白含量比较低，只检测到TNF-α和IL-6的浓度，结果显示LTRG蛋白处理后TNF-α和IL-6的浓度分别在36h和48h达到最大值，与PBS对照组差异极显著（p＜0.01）；LTRG与BSA共免疫后TNF-α和IL-6的浓度在24h达到最大值，与BSA对照组差异极显著（p＜0.01）。以上结果表明LT 可

以激活小鼠巨噬细胞炎性反应，执行抗原递呈功能，诱导机体产生体液免疫和细胞免疫应答，并且可以协同抗原提高免疫效果。

LT免疫小鼠实验中检测发现，野生型LT和突变型LTRG蛋白组的各细胞因

子分别在免疫后48h和60h左右，小鼠脾脏中IL-1β、IL-12、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-6细胞因子mRNA的表达量达到最大值，与对照组差异极显著（p＜0.01）。PBS对照组细胞因子无显著变化。表明LT及LTRG蛋白都能通过诱导细胞免疫，刺激高水平细胞因子的转录，采用流式细胞术检测LT、LTRG蛋白免疫后小鼠脾脏组织中CD4+及CD8+ T淋巴细胞的变化。结果显示，LT和LTRG蛋白免疫小鼠后脾脏中CD4+和CD8+T淋巴细胞比例相比对照组显著提高。表明，LT、LTRG刺激作用显著提高了小鼠的T淋巴细胞免疫应答能力。

综上，本研究从转录和翻译水平对LT免疫后细胞、小鼠体内多个细胞因子的变化规律进行了研究，证明LTRG蛋白能够诱导Th1、Th2型细胞免疫反应，产生体液免疫和细胞免疫，产生针对LTRG蛋白抗原的非特异性免疫应答。并能提高共免疫原的免疫效果，促使机体特异性T细胞明显增多。且LTRG蛋白对Th1、

Th2细胞免疫反应的促进作用优于野生型LT蛋白，但免疫应答时间迟于LT。

关键词：大肠杆菌不耐热肠毒素（LT）； 细胞因子； 实时荧光定量； PCR； 巨噬细胞； 液相芯片； 流式细胞术

**E. coli heat-labile enterotoxin- induced cytokine production in mice**

Abstract

Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LT) of enterotoxigenic E. coli (ETEC) is a toxic factor, which can cause diarrhea to human and animals. Furthermore it is one of the most powerful mucosal immune adjuvant and a strong immunomodulatory effects, in stimulating a variety of cytokines. However because of its strong intestinal toxicity, it can not be used as adjuvant. So many nontoxic or attenuated mutants protein were studied in order to make this adjuvant available in use. Among the mutant proteins, LTRG has much lower toxicity than the wild type LT and showed good mucosal adjuvant. In this study, the recombinant protein LTRG was used to immunize the mice, or to stimulate murine macrophages. The mRNA levels of cytokines, including IL-1β, IL-12, IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-6 were detected by using quantitative PCR. Furthermore cytokines production in the supernant of cells were detected using Luminex®xMAP®technology and T lymphocytes changes in immunized mice were analyzed using flow cytometry.

Different doses of LTRG protein were selected in stimulating the mouse macrophages in vitro and 1ug/ml LTRG protein have the best stimulation and induce the high level IL-1βand IL-4 mRNA transcription. Detection of macrophage cytokine mRNA showed IL-1β, TNF-αand IL-6 mRNA of LT stimulation reached the highest level and show significant difference (p<0.01) with the control group at 2h, 4h and 12h post stimulation. IL-12, IFN-γ, IL-4 mRNA of LT immunization reached the highest level and show significant difference (p<0.01) with the control 24h post stimulation. LTRG stimulated macrophage cytokine mRNA reached highest level a bit delay comparing with LT treatment cells, but showed higher mRNA level of six cytokines.

In order to know the adjuvant activity of LTRG protein, LTRG was co-stimulated to mice macrophages with BSA and the cytokine mRNA were also detected. The results showed TNF-αand IL-6 mRNA were the highest and showed significant difference (p<0.01) at 8h and 24h. While other cytokine mRNAs in LTRG+BSA treated cells reached the highest level and show significant difference (p<0.01) at 12h. Cytokines

Production in macrophages were detected by Luminex®xMAP®technology. The TNF-αand IL-6 concentration of LTRG treated reached the highest level comparing with the PBS control and showed significant difference (p<0.01) at 36h and 48h; TNF-α and IL-6 concentration of LTRG+BSA reached the highest level and showed significant difference (p<0.01) at 24h comparing with the BSA control. These results showed that LTRG can activate murine macrophage inflammatory response, which means LTRG can enhance the antigen-presenting cell function and induce both humoral and cellular immune responses.

The mRNA of cytokines produced in mice spleen immunized with LT or LTRG protein were also detected in different times. IL-1β, IL-12, IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-6 mRNA were in the highest level at 48h or 60h p. i. and show significant difference (p<0.01) with PBS control. The results showed that the LT and LTRG protein can induce transcription of cytokines mRNA. Furthermore CD4+ and CD8+ positive T

Lymphocytes in spleens of immunized mice were detected using flow cytometry technique. And LT and LTRG protein can both greatly enhance the percentage of spleen CD4+ and CD8+ T lymphocyte. This indicated that LT and LTRG can enhance the T lymphocyte immune activity.

In summary, mRNA and cytokine secretion in the cell and mice stimulated with LT or LTRG indicated that LT and LTRG can enhance transcription and synthesis of cytokines IL-1β, IL-12, IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-6, which were driven by Th1 and Th2 cells. Furthermore, CD4+ and CD8+ were also increased which means LT and LTRG can increase T lymphocyte nonspecific immune activity. However LTRG can enhance the

Immune reaction similar with that with LT protein, but the peak of cytokine transcription was delayed comparing with that of LT protein.

Key words: Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LT); Cytokines; Real-time fluorescence quantitative PCR; Macrophages; Luminex; Flow cytometry

目 录

[摘要](#_Toc686251385) 4

[Abstract](#_Toc686251386) 4

[引言](#_Toc686251387) 7

[1 LT的概述](#_Toc686251388) 7

[2 LT的基因与分子结构](#_Toc686251389) 7

[2.1 编码LT的基因](#_Toc686251390) 7

[2.2 LT蛋白的分子结构](#_Toc686251391) 7

[3 LT的Th物学特性](#_Toc686251392) 8

[3.1 LT与细胞膜表面的结合--GM1结合活性](#_Toc686251393) 8

[3.2 LT与ADP-核糖化因子（ARF）的结合](#_Toc686251394) 8

[3.3 LT与NAD的结合](#_Toc686251395) 8

[4 LT的佐剂功能](#_Toc686251396) 8

[4.1 LT的毒性作用](#_Toc686251397) 8

[4.2 LT的粘膜免疫原性和免疫调节作用](#_Toc686251398) 9

[4.3 LT的粘膜免疫佐剂效应](#_Toc686251399) 9

[4.4 LT突变体的研究](#_Toc686251400) 9

[5 LT诱导细胞因子免疫应答](#_Toc686251401) 9

[5.1 T细胞免疫调控作用](#_Toc686251402) 10

[5.2 CD4+T细胞的免疫调节作用](#_Toc686251403) 10

[5.3 细胞因子](#_Toc686251404) 10

[第一章 小鼠细胞因子实时定量PCR方法的建立](#_Toc686251405) 11

[1 实验材料](#_Toc686251406) 11

[1.3 菌株](#_Toc686251407) 12

[1.4 培养基及溶液配制](#_Toc686251408) 12

[2 实验方法](#_Toc686251409) 12

[2.1 小鼠脾脏总RNA提取](#_Toc686251410) 12

[2.2 总RNA的反转录反应](#_Toc686251411) 13

[2.3 引物设计](#_Toc686251412) 13

[2.4 目的片段的PCR扩增](#_Toc686251413) 13

[2.5 质粒标准品制备](#_Toc686251414) 15

[2.6 质粒纯度测定](#_Toc686251415) 16

[2.7 标准曲线的建立](#_Toc686251416) 17

[3 结果](#_Toc686251417) 17

[3.1 细胞因子基因片段重组质粒的鉴定](#_Toc686251418) 17

[3.2 细胞因子标准曲线的建立](#_Toc686251419) 18

[4 讨论](#_Toc686251420) 19

[第二章 LT诱导巨噬细胞中细胞因子动态变化的研究](#_Toc686251421) 20

[1 实验材料](#_Toc686251422) 20

[1.1 主要仪器](#_Toc686251423) 20

[1.2 主要试剂及试剂盒](#_Toc686251424) 20

[1.3 菌株和细胞](#_Toc686251425) 20

[1.4 主要试剂配制](#_Toc686251426) 20

[2 实验方法](#_Toc686251427) 21

[2.1 细胞复苏](#_Toc686251428) 21

[2.2 细胞传代](#_Toc686251429) 21

[2.3 Real-time PCR检测不同剂量LTRG对小鼠巨噬细胞中细胞因子的刺激](#_Toc686251430) 21

[2.4 Real-time PCR检测LT蛋白对小鼠巨噬细胞中细胞因子的刺激](#_Toc686251431) 23

[2.5 Real-time PCR检测LTRG与BSA协同处理对小鼠巨噬细胞中细胞因子的影响](#_Toc686251432) 23

[1.5 ×106/mL；](#_Toc686251433) 23

[2.6 液相芯片检测细胞上清液中细胞因子的变化](#_Toc686251434) 23

[2.7 数据统计](#_Toc686251435) 23

[3 结果](#_Toc686251436) 23

[3.1 不同剂量LTRG对小鼠巨噬细胞中细胞因子的影响](#_Toc686251437) 23

[3.2 LT蛋白对小鼠巨噬细胞中细胞因子的影响](#_Toc686251438) 24

[3.3 LTRG与BSA蛋白共同免疫对小鼠巨噬细胞中细胞因子的影响](#_Toc686251439) 25

[3.4 液相芯片技术分析LT对巨噬细胞中细胞因子的影响](#_Toc686251440) 26

[4 讨论](#_Toc686251441) 27

[4.1 不同剂量LTRG对巨噬细胞中细胞因子的影响](#_Toc686251442) 27

[4.2 LT蛋白对巨噬细胞中细胞因子的影响](#_Toc686251443) 27

[4.3 LTRG和BSA协同作用对巨噬细胞中细胞因子的影响](#_Toc686251444) 27

[4.4 液相芯片技术分析LT对巨噬细胞中细胞因子的影响](#_Toc686251445) 27

[第三章 实时定量PCR检测LT诱导小鼠脾脏中细胞因子动态变化](#_Toc686251446) 27

[1 实验材料](#_Toc686251447) 28

[1.1 主要仪器](#_Toc686251448) 28

[1.2 主要试剂及试剂盒](#_Toc686251449) 28

[1.3 菌株和实验动物](#_Toc686251450) 28

[1.4 主要试剂配制](#_Toc686251451) 28

[2 实验方法](#_Toc686251452) 28

[2.1 动物试验](#_Toc686251453) 28

[2.2 小鼠脾脏总RNA提取](#_Toc686251454) 28

[2.3 RNA浓度和纯度的测定](#_Toc686251455) 29

[2.4 总RNA的反转录反应](#_Toc686251456) 29

[2.5 所用引物和质粒](#_Toc686251457) 29

[2.6 Real-time PCR反应](#_Toc686251458) 29

[2.7 数据统计](#_Toc686251459) 29

[3 结果](#_Toc686251460) 29

[3.1 LT蛋白免疫后小鼠脾脏中IL-1β表达量变化](#_Toc686251461) 29

[3.3 LT蛋白免疫后小鼠脾脏中IFN-γ表达量变化](#_Toc686251462) 30

[3.4 LT蛋白免疫后小鼠脾脏中TNF-α表达量变化](#_Toc686251463) 30

[3.5 LT蛋白免疫后小鼠脾脏中IL-4表达量变化](#_Toc686251464) 30

[3.6 LT蛋白免疫后小鼠脾脏中IL-6表达量变化](#_Toc686251465) 30

[4 讨论](#_Toc686251466) 31

[第四章 LTRG感染小鼠后脾脏组织中T淋巴细胞的动态变化](#_Toc686251467) 31

[1 实验材料](#_Toc686251468) 31

[1.4 主要试剂配制](#_Toc686251469) 32

[2 实验方法](#_Toc686251470) 32

[2.1 动物试验](#_Toc686251471) 32

[2.2 脾脏淋巴细胞悬液制备](#_Toc686251472) 32

[2.3 细胞计数](#_Toc686251473) 32

[2.4 细胞表面染色](#_Toc686251474) 32

[2.5 数据统计](#_Toc686251475) 32

[3 结果](#_Toc686251476) 32

[3.1 LT免疫小鼠脾脏组织中CD3+阳性T淋巴细胞的动态变化](#_Toc686251477) 32

[3.2 LT免疫小鼠脾脏组织中CD4+阳性T淋巴细胞的动态变化](#_Toc686251478) 33

[3.3 LT免疫小鼠脾脏组织中CD8+阳性T淋巴细胞的动态变化](#_Toc686251479) 33

[4 讨论](#_Toc686251480) 33

[全文总结](#_Toc686251481) 33

[1、 建立了小鼠IL-1β、IL-12、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-6细胞因子的Real-time PCR](#_Toc686251482) 33

[参考文献](#_Toc686251483) 33

引言

大肠杆菌不耐热肠毒素（Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxin, LT）是产肠毒素性大肠杆菌（Enterotoxigenic Escherichia coli, ETEC）产生的一种能导致人或家畜肠炎和腹泻的毒性因子，感染后常因剧烈腹泻和脱水而死亡，发病及死亡率都很高。

LT具有很强的免疫调节能力，可以刺激机体产生多种细胞因子，是最强有力的粘膜免疫原和粘膜免疫佐剂之一，而LT能同时诱导细胞免疫和体液免疫[1]。但由于LT本身具有很强的肠毒性不宜直接使用，人们构建了许多无毒或低毒突变体，毒性比野生型LT降低很多[2]，也表现了良好的粘膜佐剂作用[3]，在粘膜免疫研究中和疫苗开发中具有重要医学和经济价值。

## 1 LT的概述

LT是一种热敏感免疫蛋白，由1个分子质量约28ku的A亚单位和5个分子质量约11.5ku的B亚单位经非共价键结合，其分子质量为71ku~94ku。5个完全相同的B亚单位形成环状五聚体，A亚单位位于中央，形成AB5型结构。65℃处理5min可以使A亚基与B五聚体解离，在非复性低pH值条件下，加热会导致A亚基沉淀加快，溶液中仅含B亚基。在含0.1%SDS并加热条件下可使毒素完全解离为单体，而含0.1%SDS但不加热时A亚基仅从B五聚体上解离。在无变性剂室温条件下，pH7.2可使全毒素完全解离，但有抗原性[4]。

LT根据其宿主来源，可分为人源(LT-h或h-LT)和猪源(LT-p或p-LT)两大类。LT-h和LT-p在DNA水平核蛋白水平都具有很高的基因同源性[5-7]，并且它们的理化性质和抗原性均极为相似。

根据LT编码基因来源，LT又可分为两种类型，第一类为LT-I型，由ETEC染色体外的遗传因子大质粒编码组成，而第二类为LT-II型，由染色体DNA编码产生。由于两种类型LT编码基因来源不同，因此两者在DNA水平上没有同源性，也无交叉免疫原性，但两类LT的结构组成以及发挥作用方式却很相似。天然LT-II蛋白因在自然界中十分罕见，所以目前关于LT-II研究较少；LT-I因其是发挥生物学活性的主要成份，且较为常见，所以通常所指的LT即指LT-I [8-9]。由于大肠杆菌不耐热肠毒素在免疫中发挥重要生物学功能，因此LT免疫机制及相关应用的研

究已成为当今免疫学研究的热点。

## 2 LT的基因与分子结构

### 2.1 编码LT的基因

LT基因位于野生型产毒性大肠杆菌ETEC的质粒上，基因全长1148bp[10]。该基因包括：1个A亚基（LTA）和5个B亚基（LTB），其中LTA基因是由编码240个氨基酸的编码LTA多肽基因和编码18个氨基酸的LTA信号肽基因构成。LTB是由编码103个氨基酸的LTB多肽基因和编码21个氨基酸的LTB信号肽基因构成。在编码LTA基因末尾和编码LTB信号肽基因开头处有一个移码阅读框，因而编码整个LT基因是一个连续的DNA序列。205~208位的核苷酸ATGA为LTA与LTB共同所有，其中第205位的A参与编码LTA亮氨酸(TTA)，而206~208的TGA 为

LTA终止密码子。同时205~207位的ATG为LTB起始密码子，这样LTA基因末端与LTB基因起点重合，中间没有间隔，形成了A、B亚基不同的阅读框。LTA和LTB 基因各有自身的核糖体结合位点(RBS)，可以识别相应的阅读框。A亚基

RBS处自由能为△G =-5.2kca1, B亚基RBS处自由能为△G =-7.2kcal，B亚基的翻译效率高于A亚基，以适应AB5型全毒素的需要。

### 2.2 LT蛋白的分子结构

LT蛋白由一个A亚基和五个B亚基组成，现分述如下：

#### 2.2.1 LTA的结构

A亚基是由A1、A2两部分组成，两个片段之间借以一个二硫键连接[11]（A：

187－199）（图1.1, 引自SixmaTK[12]）。A1片段具有ADP-核糖基转移酶活性，是

A亚基的毒性部分；A2片段作为一个中介，将A1片段与B亚基连接起来。

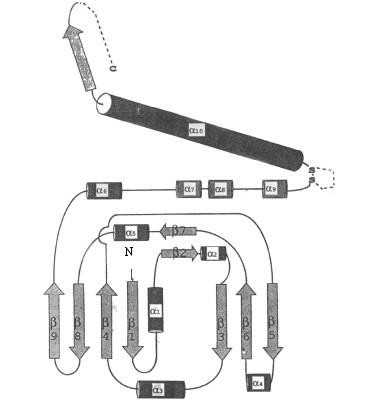


图1.1 LTA的二级结构（引自Sixma TK[12]）

Fig. 1.1 Schematic secondary structure diagram of A subunit(From Sixma TK[12])

从图1-2（引自Williams NA[13]）可以看出A1片段是明显的非球形结构，从某角度[14]看为一“V”字形。A1片段含有的二级结构较多，包括9个α螺旋和9个β折叠。其中α螺旋起始于第200位氨基酸，由23个残基构成，该螺旋构形复杂，被两端侧翼包围，位于A1侧面。A2与A1片段之间有许多相互作用，如借范德华力、氢键和盐桥（A2: Asp225-A2: Arg146）等相互作用。

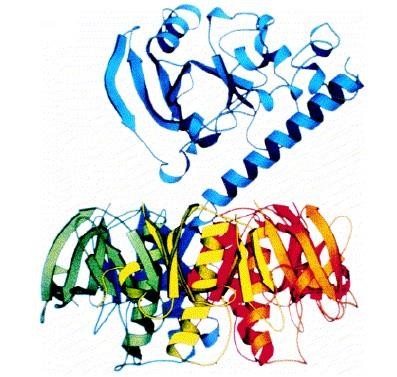


图1.2 LT的三维结构（引自Williams NA[13]）

Fig. 1.2 Three-dimensional structure of heat-labile enterotoxin(From Williams NA[13]）

#### 2.2.2 LTB的结构

LTB由2个α螺旋和6个β折叠组成，主要结构为一个小的N端螺旋α1和一个中央螺旋α2，两个β折叠形成的三联片层结构I（β2, 3, 4）和II（β1, 5, 6）。

α1螺旋较小，位于肽链的N端；α2螺旋较大，位于肽链的中央。每个B亚单位的三联片层结构I与相邻三联片层结构II反向平行，形成六联β折叠。（图1.3, 引自Sixma 1991[12]）。



图1.3 B亚单体与五聚体的二级结构（引自Sixma TK[12]）

Fig. 1.3 Schematic secondary structure diagram of a single B subunit and the B pentamer(From Sixma TK[12])

N端的α1螺旋和β5折叠之间主要靠9~86的二硫键联系。α2螺旋在五聚体的

中央形成一个30A长的桶状结构，该螺旋与A亚单位表面直径的距离为11A，与五聚体顶端的距离为15A。该区域的多肽在LT的免疫原性中起到重要作用，可诱导产生抗LT和CT的抗体[15]。B亚基只在相邻亚单位之间发生相互作用，主链作用包括亚单位界面上的β2和β6间的作用以及许多副链间的作用，如中央螺旋都有18度角以利于B亚基副链间连锁。而B亚基第64位Ala与相邻B亚基的第

33位Met相互作用，这就是A64V影响五聚体形成的重要原因[16]。五聚体形成以后，单体被包埋的表面积为2360A2，约占单体可接近表面的39%[17]，这是在蛋白多聚体中发现的最大百分比[18]，可能是五聚体稳定性好的原因之一[19]。

#### 2.2.3 AB5六聚体结构

LT全毒素为分泌性表达，LTA和LTB都是以前体蛋白形式被结合，在各自信号肽的引导下被转运至胞周质后信号肽被切除，成熟的A、B亚基自我折叠，完成

LT的组装[20]。A2片段介导A亚基与B亚基五聚体的相互作用，并且A2片段与B五聚体中的每个LTB单体都有不同的相互作用，其C末端插入B五聚体高电荷的中心孔洞。如果A亚基C末端缺失14个氨基酸即丧失与B亚基组装的能力，仅缺失最后4个氨基酸时不会发生这种现象，说明A亚基C末端-14-4的区域对于促进B亚基的聚合具有重要作用。同时发现，缺失C末端4个氨基酸虽然能促进B亚基的聚合，但不能形成稳定的AB5全毒素结构。这说明A亚基最后4个氨基酸作为锚定序列，在全毒素组装过程中具有维持A、B亚基之间稳定的功能。

LTB进入细胞周质后立即进行五聚体组装，然后与LTA结合。1min内胞周质

中的LTB 80%寡聚化，超过50%的寡聚体与LTA形成全毒素。A亚基表达量相对于B亚基来说是过量的，过量的LTA半衰期为20分钟左右，由于LTA的降解与LTB寡聚体的结合，因此LTA与LTB五聚体保持1.4: 1.7的比例。约60%的

LTA和LTB五聚体结合形成全毒素，剩余部分保持自由状态并最终被降解[21]。

## 3 LT的Th物学特性

### 3.1 LT与细胞膜表面的结合--GM1结合活性

B亚基与靶细胞表面上的神经节苷脂GM1 受体结合是LT 进入细胞的关键

[22-23]. LT毒素定位到细胞膜上，是通过其B亚基与小肠上皮组织中靶细胞表面的

GM1结合来完成的[24-25]. B亚基中第33位氨基酸Gly（Gly33）在与神经节苷脂

GM1结合过程中起到了关键作用，在β2和β3之间形成一个β转角，将Gly突变为Asn后是B亚基失去了与神经节苷脂GM1的结合能力[26]，这可能改变了局部骨架构形。除神经节苷脂GM1外，B亚基还可与asialo-GM1、GD1b-神经节苷脂受体、lactosylceramide及某些半乳糖蛋白结合[27-28]。

### 3.2 LT与ADP-核糖化因子（ARF）的结合

LT发挥细胞毒性作用的关键步骤是A1片段与ADP核糖基化转移酶的结合。当A1片段与一个20kDa的鸟嘌呤核苷酸-ADP核糖基转移因子的相互作用后，可增强其ADP-核糖基酶活性[29]，从而激活腺甘酸环化酶。ARF结合于A1，A2片段与A1片段竞争结合，则有利于ARF调节LT从细胞表面向内质网移动[30]。

### 3.3 LT与NAD的结合

LT的A亚单位不具备与NAD结合的βαβ折叠结构。LT催化位点是由一个β折叠构成腔隙的地板和一个α螺旋构成腔隙的天花板构成，位于腔隙两侧β折叠的Arg7[31-32]和Glu110-Glu112[33-34]起到了非常关键的催化作用。

## 4 LT的佐剂功能

### 4.1 LT的毒性作用

动物机体感染ETEC时，大量LT在肠道蓄积，B亚基与小肠上皮细胞膜上的神经节苷脂GM1结合形成LT和GM1复合物，该复合物在质膜不溶性空泡样结构域聚集，该膜结构域内陷使LT以小泡形式进入细胞内，并被转运到高尔基体，在高尔基体上LT的A、B亚基分离。A亚基被转运到内质网上，通过胰蛋白酶的作用，在含有精氨酸的位置A亚基的A1与A2片段分离。A1片段跨膜转移到胞浆，

A1片段的疏水作用并不与内质网分离，在胞浆中它与ADP核糖基化因子结合，

能催化肠道上皮细胞表面腺苷酸环化酶复合物GTP结合蛋白二磷酸腺苷核糖化反应（ADP-ribosylation），使腺甘酸环化酶活化，细胞内cAMP水平上升（图1-4, 引自PizzaM2001[35]）。结果导致肠道上皮细胞离子流改变、水分减少，使大量水分和电解质分泌肠腔中引起腹泻[36-38]。



图1.4 大肠杆菌不耐热肠毒素结构与其作用示意图（引自Pizza M 2001[35]）Fig.1.4 Schematic representation of the structure and toxic function of LT

(From Pizza M 2001[35])

### 4.2 LT的粘膜免疫原性和免疫调节作用

#### 4.2.1 LT的粘膜免疫原性

LT具有很强的粘膜免疫原性，是迄今为止发现的最有效的粘膜免疫原之一，已广泛应用于人和动物的实验中。一般认为粘膜免疫应答的基础是LT/LTB与粘膜表面的受体特异性相结合[39]。De Haan等研构建不具有GM1结合能力的B亚基第

33位甘氨酸天冬氨酸突变体LT-G33D、LTB-G33D，用它们鼻饲小鼠后发现这些分子明显缺乏产生LTB特异性血清IgG和鼻粘膜IgA的能力，证明GM1结合LT/LTB活性在免疫原性中起到关键作用。动物实验证实LT全毒素分子明显比LTB五聚体有更强的免疫原性，LTA的ADP-核糖基化活性在LT免疫原性中可能也发挥一定作用[40]。也有研究表明LT诱导的粘膜免疫应答不仅发生在抗原沉积部位，在其他粘膜效应部位也产生同样的免疫应答[41]。

#### 4.2.2 LT的免疫调节作用

LT的免疫调节作用如图1.5所示，主要与神经节苷脂GM1结合活性有关[42]。

通过B亚基与免疫功能相关的白细胞结合，促进细胞因子生成，调节抗体的产生，因而具有强烈的免疫调节作用。LT不仅能诱导B细胞同种型和亚类的分化应答，而且在B细胞活化，同种型转化、克隆扩展和B细胞分化的终止等过程发挥调节作用。LT 诱导的粘膜免疫应答依赖于T 淋巴细胞，受到主要组织相容性复合体

（MHC-II）类分子la亚区的限制[43]。而LT诱导的CD4＋T淋巴细胞反应包括Th1

和Th2型免疫应答，且Th1/Th2型应答保持一定的平衡。



图1.5 LTB结合于GM1受体后的免疫调节机制(引自Williams NA[13])

Fig. 1.5 Mechanisms of immune modulation resulting from GM1 binding by the LTB(From Williams NA[13]）

### 4.3 LT的粘膜免疫佐剂效应

大量研究表明胃肠外免疫激发的系统免疫能有效清除系统感染，但却很难对黏膜有保护作用。对粘膜免疫系统的有效刺激需要两个条件：一是疫苗抗原能够有效地被传递到黏膜淋巴组织，二是合适的黏膜佐剂。黏膜佐剂的选择对于黏膜免疫至关重要。目前一些细菌来源的物质已被用作黏膜疫苗的佐剂，其中已被证实具有极大潜力的黏膜佐剂是霍乱毒素（Cholreatoxin, CT），大肠杆菌不耐热肠毒素（Heat-Labile Enterotoxin, LT），CpG二核苷酸序列和单磷酰基脂A[44]。

而LT具有很强的免疫调节能力，可以刺激机体产生多种细胞因子，目前关于

LT粘膜免疫佐剂作用机制，还存在许多争议。Lycke等[45]认为LT通过刺激肠道上皮细胞，可以使肠粘膜通透性增加，致使肠道淋巴系统摄取更多的抗原，从而增强机体免疫反应。Beignon等[46]认为LT是通过不同免疫细胞间的相互作用和细

胞因子间的信息传递来达到其免疫增强效果。

另外，LT的某些生物学特性也可能影响其佐剂活性，如LT与GM1结合活性以及ADP-核糖基化酶活性，但他们在其佐剂活性中是否发挥作用和发挥多大作用一直存在争议。

Dehaan等根据重组LTA和流感疫苗鼻饲共免疫小鼠后，LTA能诱导机体产生针对流感疫苗的高水平特异抗体，认为LTB与GM1结合亲和力对LT的佐剂活性无明显相关[47]。而Guidry等用同样的突变体作佐剂却发现与GM1结合的亲和力丧失，并严重影响LT佐剂活性。前者采用的免疫途径是滴鼻，后者是口服和皮下给药，因此差异是否来源于不同免疫途径还有待进一步研究。

目前已经构建了多种缺乏ADP-核糖基化酶活性的LT突变体，用来研究ADP-核糖基化酶活性在LT粘膜免疫佐剂中的作用。Lycke等根据缺乏ADP-核糖基化酶活性的LT-E112K（Glu→Lys）突变体与KLT口服免疫小鼠，LT-E112K几乎不能增强机体产生KLT粘膜免疫应答，认为LT的ADP-核糖基化活性与其佐剂活性有直接关系[48]。Brereton等[49]根据LT与LT-S63K（Ser→Lys）都具有粘膜免疫佐剂活性，但后者不及前者佐剂活性高，认为ADP-核糖基化酶活性在LT的免疫佐剂活性中起到一定作用。基于以上研究结论，推测LTA可能存在某些未被鉴定的性质与其佐剂活性有密切联系。

### 4.4 LT突变体的研究

由于A亚基具有较强的细胞毒性，因而人们主要限于对LT无毒突变体及B亚基的研究。对LT突变体的研究主要从以下三个方面进行，即（1）单独用无毒的LTB或将B亚单位采用化学或基因融合的方法连入疫苗；（2）用B亚单位和全毒素作为佐剂；（3）对毒素进行化学修饰或用突变法脱毒同时保留佐剂活性。第三种突变方法研究应用较多。

目前对LT的定点突变区域主要集中在A1/A2片段连接结构域和酶活性结构域。前者通过突变A1/A2片段连接结构域的关键氨基酸使LT变为无毒或低毒。这种方法改造的突变体较多，其中较为成功的是失去ADP-核糖基酶活性的LTAK63

（Ser→Lys）和低毒的LTA72R（Ala→His/Arg）突变体。经比较发现LTAR72佐剂活性高于LTAK63，但LTAR72却有一定的毒性。后者通过突变酶活性结构域的关键氨基酸使LT对蛋白水解酶的敏感性降低，游离的A1片段减少从而使毒性减小。其中较为成功的突变体有在体外无毒但在体内仍有毒的LTR192G（Arg→Gly），其接受剂量在5～50μg剂量的LTR192G时较为安全，但是接受剂量达到100μg时则出现了腹泻。

Tierney R等[50]利用突变体LTK63和LTR72都诱导出破伤风毒素IgG1抗体，

证实减毒的LT突变体是有效的粘膜免疫佐剂。Lu Xiuhua等[51]分别用野生型LT和LTG192作为佐剂让小鼠口服灭活流感疫苗，结果表明加有佐剂的疫苗更能增强呼吸道感染的保护作用。Celeste C等[52]通过单独使用灭活的沙门氏菌或LTG192与灭活的沙门氏菌协同口服免疫小鼠，发现LTG192与沙门氏菌协同免疫产生的体液免疫和细胞免疫水平与单独使用沙门氏菌相比有所提高，而且能产生高水平的IFN-γ、IL-2和IgG. Antoinette B等[53]用LT、LTG192和减毒志贺菌弱毒苗共同免疫动物，发现LT和LTG192的佐剂活性无显著差异，但都显著增强了免疫反应。Nicollier J B 等用病毒样颗粒（VLPs）接种小鼠检测其免疫反应，结果显示只用

VLPs 鼻饲给药的小鼠产生了高水平的血清抗体反应和排泄物IgA，而用LT 或

LTG192共给药能加强其抗体反应，且通过口服途径也有效[54]。

对LT的双突变体，研究较多的是LTK63、LTR72、LTG192，这些突变体分别表现出不同程度的残余毒性和酶活性。因此，为了减小这些分子的毒性并保持LT免疫调节活性，人们构建出免疫效果更好的双突变体粘膜免疫佐剂。不同突变体效应不同，如能诱导Th1/Th2的免疫反应的LTK63，佐剂活性比LTR72低，但

LTR72更倾向于诱导Th2反应。为了利用两者的优点，Feng Q等[55]用PCR方法构建了双突变体LTK63/R72，通过胰酶消化、毒性和免疫原性检测产生特异性的抗体水平很低，这种双突变体的免疫原性与野生型LT无明显差别，其敏感性介于两者之间，而其佐剂活性更类似于LTK63。唐思静等[56]获得的LT 双突变体

LTK63/G192、LTR72/G192与鸡新城疫（NDV）一起滴鼻免疫小鼠和雏鸡，结果显示LTK63/G192、LTR72/G192、LT组抗特异性NDV的IgG、IgA比只使用NDV免疫组的高，双突变体都具有佐剂作用，而且优于野生LT；其中LTR72/G192的佐剂效果最为理想，检测ADP-核糖转移酶活性和小鼠毒性活性均比野生LT有不同程度的降低。双突变体可以显著增强鸡新城疫低毒力活疫苗免疫小鼠和雏鸡的效果。以上众多研究结果表明双突变体具有良好的粘膜佐剂活性及免疫应答价值。

## 5 LT诱导细胞因子免疫应答

人们发现野生型LT、LT突变体以及B亚基与外源抗原共同免疫机体后，可调节机体免疫系统。LT作为粘膜免疫佐剂可以诱导机体产生特异、高效价的粘膜

sIgA和血清IgG，但不产生IgE；LT对体液免疫和细胞免疫均有增强作用，例如

LT诱导肠集合淋巴结（PP）产生抗原特异的T淋巴细胞（包括Th1和Th2细胞）和B细胞应答，提高血清IgG1、IgG2a、IgG2b及肠道粘膜sIgA的抗体水平；LT

还能使抗原特异的T细胞、MHC-I限制的细胞毒T细胞（CTL）和IL-2显著增多，从而引发明显的迟发型超敏反应[57]。

### 5.1 T细胞免疫调控作用

免疫应答是指人和动物机体的免疫系统受到抗原刺激后，免疫细胞对抗原分子识别并产生一系列复杂免疫连锁反应，并表现出一定生物学效应的过程。在这一过程中，抗原特异性淋巴细胞（T、B淋巴细胞）对抗原提呈细胞（APC）提呈抗原的免疫识别、自身活化、增殖、分化和发挥免疫效应的重要前提，表达于T细胞表面的T细胞受体（TCR），提供了T细胞识别特异性抗原的结构基础[58-60]。

T细胞是介导细胞免疫应答的重要淋巴细胞[61]，在机体防御系统中发挥重要作用。T细胞抗原受体（TCR），是表达与T淋巴细胞表面识别自身MHC-抗原肽复合物的受体。成熟的T细胞按其CD分子表型不同，可分为CD3+CD4+CD8-T细胞和CD3+CD4-CD8+T细胞两大亚群，分别简称为CD4+T细胞和CD8+T细胞[62]。

CD3+分布于所有成熟T细胞的表面，几乎可以反映外周血中T细胞（包括CD4+T

细胞和CD8+T细胞）的总量。

T细胞按功能不同，又可分为辅助性T细胞、细胞毒性T细胞和抑制性T细胞3种。CD8+T细胞在机体免疫系统中起到负调控作用，属于细胞毒性T细胞，通过分泌淋巴因子来抑制其他免疫细胞的活性，如抑制B细胞介导体液免疫应答、

CD4+T细胞介导迟发型超敏反应，同时还可调控自然杀伤细胞和巨噬细胞的杀伤功能[63]。CD4+T细胞主要是辅助性T细胞，通过释放细胞因子如IL-2、IFN-γ等，激活巨噬细胞、NK细胞，参与机体抗肿瘤免疫效应。CD4+T细胞激活后根据其分泌细胞因子的不同又分为两个功能亚群：即Th1型和Th2型。Th1型和Th2型细胞及其各自分泌的细胞因子在机体起到重要的调控作用。

T细胞的表型和功能之间虽有一定的关系，但并不完全一致，如CD4+T细胞和CD8+T细胞均有部分细胞是抑制性T细胞，起免疫抑制的作用[64]。总体上说

CD8+T细胞具有与CD4+T细胞相反的作用，可导致正常免疫应答的抑制。在正常情况下，两者相互诱导和制约形成T细胞网，对调节细胞免疫反应和维持免疫平衡具有重要意义[65]。测定CD4+T细胞、CD8+T细胞、CD4+/CD8+T细胞比值可在一定程度上反映机体免疫功能，当CD4+T细胞下降、CD4+/CD8+T细胞比值下降或CD8+T细胞上升时，机体免疫功能低下；而免疫功能的恢复或好转首先表现为

CD4+T细胞上升、CD4+/CD8+T细胞比值上升或CD8+T细胞下降[66]。CD4+T 和

CD8+T细胞相互协调、相互制约，使二者处于平衡状态。但当这些淋巴细胞受到某种因素刺激后，原有平衡状态受到破坏，从而使T细胞产生潜在的细胞毒性，引发各种免疫损伤[67]。

### 5.2 CD4+T细胞的免疫调节作用

CD4+T细胞的两个亚群包括Th1型和Th2型。Thl型细胞分泌的细胞因子称为Thl型细胞因子，主要有IL-1、IFN-γ、TNF-α等。Thl型细胞因子属于炎性细胞因子，能促进抗体IgG2α的产生。Th2型细胞分泌的细胞因子称为Th2型细胞因子，主要有IL-4、IL-6、IL-10等[68-69]. Th2型细胞因子主要参与体液免疫应答，能促进IgG1和IgE抗体产生和嗜酸性粒细胞活化。而LT能同时诱导细胞免疫和体液免疫。

除了CD4+T细胞、CD8+T细胞、杀伤性T细胞(CTL)和自然杀伤细胞(NK)外，一些非免疫细胞也能产生Th1、Th2型细胞因子[70]。在正常情况下也并不是Th1型细胞因子表达越少Th2型细胞因子表达越多越有利于，而是二者的平衡关系至关重要[71-73]。

两类CD4+细胞对细胞因子的反应性不同，在T/B细胞比例较低时，Th1型细胞能辅助B细胞产生抗体(IgA、IgG2a和IgM类)。如IFN-γ能够诱导Th1型细胞分化同时抑制Th2型细胞增殖；IL-4能够诱导Th2型细胞分化，但又可与IL-13等一起抑制Th1型细胞功能；IL-2可同时诱导Th1和Th2型细胞增殖。因为Th1/Th2之间的平衡在免疫应答调节中起到关键作用，所以Th1/Th2平衡与多种疾病的发生、发展有密切关系。目前已发现很多感染性疾病、过敏性疾病、自身免疫性疾病等都有与Th1/Th2的平衡有关。

### 5.3 细胞因子

细胞因子（cytokine, CK）是一类能在细胞间传递信息、具有免疫调节和效应功能的蛋白质，它可由多种细胞产生，作用于免疫系统、造血系统、神经系统、[内分泌系统](http://baike.baidu.com/view/92172.htm)，在细胞间相互作用、细胞的增殖分化和效应功能等方面发挥重要调节作用。细胞因子通过与靶[细胞膜](http://baike.baidu.com/view/32273.htm)表面的受体相结合并将信号传递到细胞内部，促进或抑制其他细胞因子的合成、释放，进而影响细胞代谢、增强抗感染和杀伤[肿瘤细胞](http://baike.baidu.com/view/2921695.htm)效应、促进炎症过程[74]、介导免疫应答[75]，机体内细胞因子表达发生异常时，会导致疾病的发生、病情加重。现就其主要Thl型(IL-1β、IL-12、IFN-γ、TNF-α)、Th2型(IL-4、IL-6)细胞因子加以介绍。

#### 5.3.1 Th1型细胞因子

##### 5.3.1.1 IL-1β

IL-1主要由活化的单核巨噬细胞系统产生，也可由上皮细胞、内皮细胞和星形胶质细胞及其他多种细胞合成和分泌[76]。它是一种多效的炎性细胞因子，可作用于动物机体的各个系统，具有广泛的生物学活性，在介导炎症反应、影响组织代谢和参与免疫调节方面发挥重要作用。IL-1由IL-1α和IL-1β两个亚型组成，两

者由不同但相关的基因编码，来源于共同的原始基因。最初以31KD的前体蛋白pro-IL-1α和pro-IL-1β形式存在，经加工成为17KD的IL-1α、IL-1β成熟蛋白。两者的氨基酸序列同源性仅为22%，但它们的生物学效应一致。IL-1α主要存在于细胞内，其本身具有生物学活性，只调节细胞内生理活动[77]，当有细胞死亡时，IL-1α从细胞内释放出来。

IL-1β与IL-1α不同，其不具有生物学活性，只有被活化的caspase–1降解以后，成熟的IL-1β才可分泌到细胞外，发挥其生物学作用。IL-1β能促进T细胞、胸腺细胞的活化、增殖和分化，还能影响B细胞功能，促进IL-2、IL-6和TNF等多种免疫分子的基因表达。一些免疫复合物及其细胞因子（如IL-2、IFN-γ、TNF-a、GM-CSF等）、多种微生物的产物（如炭疽致死毒素、刺尾鱼毒素等）均可促进IL-1β的分泌。由于受一些外源性刺激诱导，IL-1β在呼吸道、胃肠道、脾脏及一些与外界病原体接触较多的组织中表达量较高。如在某些病理情况下（脓毒症、痛风等），机体发生炎症反应时IL-1β往往过量表达。

##### 5.3.1.2 IL-12

IL-12主要由单核巨噬细胞、B细胞产生，它的分子是一种异型二聚体。其主要作用于T细胞和NK细胞，曾被命名为细胞毒性淋巴细胞成熟因子和NK细胞刺激因子。它可刺激活化型T细胞增殖，促进Th1型细胞分化，并抑制Th2型细胞分化和IgE合成；同时能诱导CTL和NK细胞的细胞活性并促进其分泌IFN-、TNF-α、GM-CSF等细胞因子，促进NK细胞、IL-2rα、TNF受体以及CD56分子的表达，增强对肿瘤细胞的ADCC效应。由于IL-12[在抗肿瘤免疫](http://baike.baidu.com/view/264315.htm)以及抗感染免疫中有重要作用，IL-12与IL-2协同作用促进CTL和LAK细胞的产生，构成一种有效的肿瘤免疫治疗方法。

##### 5.3.1.3 IFN-γ

[根据干扰素](http://baike.baidu.com/view/39799.htm)产生的来源和结构不同，可分为IFN-α、IFN-β和IFN-γ，分别由白细胞、成纤维细胞和活化T细胞所产生。各种不同的IFN生物学活性基本相同，都具有抗肿瘤、抗病毒和免疫调节等作用。

IFN-γ是由活化的T细胞和NK细胞产生的一类具有高活性、多功能的可溶性糖蛋白，具有抗病毒和抗肿瘤的作用，促进细胞介导的免疫应答[78]。IFN-γ是重要的Th1型因子，可以促进Thl型细胞的成熟、增殖和分化，对Th2型细胞有抑制作用，下调体液免疫应答降低IL-4、IL-10的活性[79]。IFN-γ能提高单核-巨噬细胞、树突状细胞的抗原提呈能力，诱导单核-巨噬细胞的MHC-II类抗原及B7分子的表达量增加，增强细胞毒性作用，还可抑制巨噬细胞、粒细胞、集落刺激因子

（GM-CSF）的产生。

##### 5.3.1.4 TNF-α

TNF根据其产生来源和结构不同主要有两种，由激活的单核-巨噬细胞产生的称为TNF-α，由激活的T淋巴细胞产生的称为TNF-β或淋巴毒素。两类TNF生物学活性基本相似，除了具有杀伤肿瘤细胞外，还有免疫调节、参与发热和炎症反应等作用。

TNF-α是肿瘤坏死因子的主要成员，主要由单核细胞和巨噬细胞产生，能杀伤和抑制肿瘤细胞，激活巨噬细胞和NK细胞，间接发挥作用；促进中性粒细胞吞噬，诱导肝细胞急性期蛋白合成；具有调节白细胞迁移、增殖、分化等活性。并参与某些自身免疫病的病理损伤，直接诱导肿瘤细胞凋亡，是一种重要的炎症因子。TNF-α连接天然免疫和获得性免疫，在感染和自身免疫中起到重要作用，可以激活吞噬细胞杀灭病原体，刺激靶细胞合成分泌细胞因子（如IL-1、IL-6、IL-8等），是细胞因子级联反应的起始因子。还能增强T、B细胞对抗原和有丝分裂原的增殖反应、Tc细胞对靶细胞的杀伤活性。同时具有类似于干扰素的抗病毒作用，能直接杀伤病毒感染细胞。TNF-α具有致热作用，直接作用于下丘脑体温调节中枢；刺激巨噬细胞释放IL-1。

#### 5.3.2 Th2型细胞因子

##### 5.3.2.1 IL-4

IL-4[主要由单核巨噬细胞](http://baike.baidu.com/view/428057.htm)、成纤维细胞、[血管](http://baike.baidu.com/view/43285.htm)内皮细胞产生，是Th2型反应代表性细胞因子，促进[Th0细胞](http://baike.baidu.com/view/3156834.htm)向Th2细胞分化，是Thl分化的强烈抑制物，在天然免疫中起负调节作用，能够促进机体产生免疫耐受。此外，IL-4还是基因类转换的主要调节因子，可促进抗原或丝裂原活化的B细胞增殖，下调MHC限制性细胞毒性作用，上调MHC II类分子来增强免疫耐受，提高B细胞的抗原递呈能力，因此曾称为B细胞刺激因子。

IL-4能够刺激[T细胞](http://baike.baidu.com/view/1568.htm)增殖和CTL活化；刺激肝细胞合成急性期蛋白，并参与炎症反应；还可以与CSF协同作用，促进骨髓造血前体细胞增殖、诱导髓样细胞定向分化，从而促进血细胞发育。其通过抑制IL-1、IL-2和IFN-γ等细胞因子的产生，来抑制巨噬细胞和NK细胞的活化，从而使机体免受这两种杀伤性细胞的攻击[80]。当巨噬细胞受刺激后II类抗原表达量明显增加，同时巨噬细胞递呈抗原的能力及对肿瘤细胞的细胞毒素作用也显著增强。

##### 5.3.2.2 IL-6

IL-6是一般是炎症指标，由多种细胞产生，包括单核-巨噬细胞、活化T细胞、上皮细胞、内皮细胞以及成纤维细胞等。可以刺激T细胞、B细胞、杂交瘤细胞增殖，促进细胞毒性T细胞和巨嗜细胞分化、B细胞产生免疫球蛋白，还能诱导

急性期反应蛋白的产生，对神经、造血、内分泌系统具有广泛生物学效应。IL-6能促进T细胞表面IL-2表达，增强IL-1和TNF对Th型细胞的致有丝分裂作用；还能促进B细胞增殖、[分化并产生抗体，如多发性骨髓瘤](http://baike.baidu.com/view/124679.htm)的恶变时B细胞既能产生IL-6，又能对IL-6发生应答。IL-6可以有效地促进IL-1和TNF诱导的恶病质、糖皮质激素合成、骨髓造血的功能，以及刺激破[骨细胞](http://baike.baidu.com/view/705219.htm)活性和角质细胞生长。但IL-6不能刺激相应[细胞分泌](http://baike.baidu.com/view/432009.htm)其它细胞因子，对免疫细胞的自分泌作用也比较弱，主要功能是加强其它细胞因子的效果。

综上所述，LT具有粘膜免疫原性和免疫调节作用，在动物机体内能发挥良好的粘膜免疫佐剂效应，它的突变体可以使其毒性降低或消失，但仍保留其免疫佐剂活性。LT对T细胞具有免疫调控作用，能够促进Th1和Th2型细胞因子产生，从而诱导细胞因子产生免疫应答。尽管对LT佐剂功能作用机制还不十分清楚，但通过对LT的深入研究，将会为拓展疫苗免疫的新途径提供有效方法。

# 第一章 小鼠细胞因子实时定量PCR方法的建立

荧光定量PCR技术是一项核酸检测与定量的技术[81]。其原理是：在PCR反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号收集实时监测整个PCR的过程。可分为染料类（SYBR Green I）和探针类（Taqman水解探针、Beacon杂交探针和FRET）[82-83]. SYBR Green I是一种能与双链DNA结合发光的荧光染料，可以根据荧光信号检测出PCR体系中存在的双链DNA数量。而探针类则是利用与靶序列特异杂交的探针来指示扩增产物的增加，探针与靶序列结合，具有引物和探针的双重特异性，因而减少了假阳性的发生，提高了定量的特异性和准确性。这两种方法在检测免疫后RNA或DNA[84]以及细胞因子变化[85]中发挥重要作用。

为了研究LT蛋白免疫后小鼠细胞因子的变化规律，本实验设计了6个基因保守区引物，建立了荧光定量PCR方法，通过构建细胞因子的重组质粒，建立基于

（SYBR Green I染料和Taqman探针）的Real-time PCR标准曲线和回归方程，为下一步定量检测LT免疫后小鼠细胞因子mRNA表达量的变化提供基础。

## 1 实验材料

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1.1 | 主要仪器  ABI 7500 荧光定量 PCR 仪 | ABI 公司 |
|  | PCR 仪  琼脂糖凝胶电泳装置凝胶成像分析系统 恒温摇床 | BIO-RAD 公司BIO-RAD 公司BIO-RAD 公司  太仓 TCZ-1 |
|  | 恒温培养箱 | 上海益恒公司 |
|  | 低温离心机循环水浴锅分光光度计 | Sigma 公司  Julabo 公司  Eppendorf 公司 |
|  | 超净台 | 苏净集团安泰公司 |
| 1.2 | 主要试剂及试剂盒  SYBR® Premix Ex TaqTM | TaKaRa 公司 |
|  | Premix Ex TaqTM(Probe qPCR) | TaKaRa 公司 |

DNA marker DL2000 TaKaRa公司

Ex Taq酶TaKaRa公司

PMD 18-T载体试剂盒TaKaRa公司

反转录试剂盒TaKaRa公司

质粒提取试剂盒Axygen公司

DNA胶回收试剂盒Axygen公司

总RNA提取试剂盒北京艾德莱生物科技有限公司

蛋白胨OXOID LTD公司

酵母提取物OXOID LTD公司

琼脂粉上海生工生物工程有限公司

琼脂糖上海生工生物工程有限公司

Gold view染料赛百胜公司

无水乙醇，异丙醇北京鼎国公司

### 1.3 菌株

E. coli. DH5α感受态菌株由本实验室制备并保存。

### 1.4 培养基及溶液配制

#### 1.4.1 抗Th素类

100mg/mL氨苄青霉素（Amp）贮存液：1g氨苄青霉素溶于10mL双蒸馏水中，用0.22μm微孔滤膜过滤除菌，分装成小管，-20℃贮存。

#### 1.4.2 LB培养基

LB培养液体基（1L）：10g蛋白胨、5g酵母提取物、10g NaCl用去离子水定容1L，高压灭菌20分钟。

LB固体培养基（100ml）：1g蛋白胨、0.5g酵母提取物、1g NaCl定容100 ml后，再加入培养级琼脂15g，高压灭菌20min。待温度降到60℃左右时，将其缓慢地倒入无菌平板，培养基冷却凝固后倒置于4℃冰箱保存或放于密封袋中室温保存。

#### 1.4.3 TAE电泳缓冲液1L(50×TAE)

242g Tris碱、57.1ml冰醋酸、37.2g Na2EDTA·2H2O 加去离子水定容1L，调

PH约8.5，使用时工作浓度为1×，用去离子水稀释。

#### 1.4.4 1%琼脂糖凝胶配制（50ml）

把0.5g琼脂糖容于50ml去离子水，微波炉加热溶化，加入5μl Gold view染料，混匀，室温后倒胶，待胶完全凝固，上样电泳。

#### 1.4.5 TFB溶液配制

3.248g MgCl2、0.588gCaCl2，用双蒸水定容到200ml，高压灭菌20分钟。

#### 1.4.6 DH5α感受态细胞制备

(1)将保存的DH5α菌种划LB（无抗）平板，37℃培养12-16h；

(2)在LB平板上挑取单一DH5α菌落，接种于3ml LB液体培养基中，37℃震荡培养过夜；

(3)按1: 100比例转接到100ml LB液体培养基中，震荡培养至OD600值在0.6

左右，大约需2h；

(4)将菌液转移到50ml离心管中，4℃，3500rpm/min离心10min收集细胞；

(5)用20ml冰冷的TFB溶液轻悬菌体，4℃，4100rpm/min离心10min收集细胞；

(6)用30ml冰冷的TFB溶液轻悬菌体，冰浴30min，4℃，4000rpm/min10min收集细胞；

(7)加入3400ul的TFB和600μl冰冷的甘油，混匀，100μl分装；

(8)液氮速冻，放入-80℃冰箱保存。

## 2 实验方法

### 2.1 小鼠脾脏总RNA提取

采用北京艾德莱生物科技有限公司的总RNA提取试剂盒，提取小鼠脾脏中的

RNA，具体步骤如下：

（1）将脾脏组织研磨，取适量组织（20-30mg左右）。加入600ul裂解液，在振荡器上震荡1min，使其充分裂解；

（2）将产物13000rpm离心3min，上清液全部移入DNA清除柱上；

（3）立即13000rpm离心60s，保留滤过液；

（4）用微量移液器较精确估计滤过液体积，加入等体积70%乙醇，立即吹打混匀；

（5）将混合物移入一个吸附柱RA中，13000rpm离心30s，弃掉废液；

（6）加入700ul去蛋白液RW1，室温放置1min, 12000rpm离心30s，弃掉废液；

（7）加入500ul漂洗液RW，12000rpm离心30s，弃掉废液。加入500ul漂洗液

RW，重复一遍；

（8）将吸附柱RA，放入一个RNase free离心管中，在吸附膜中间部位加40ul RNase free water，室温放置1min, 12000rpm离心1min；

（9）将提取的RNA立即进行反转录或-80℃保存备用。

### 2.2 总RNA的反转录反应

采用TaKaRa公司的反转录试剂盒，操作参照AMV反转录酶使用说明书进行。

###### （1）配置反应液：

MgCl2 2 ul

10×RT Buffe r 1 ul

DNTP Mixture 1 ul

RNase Inhibitor 0.25 ul

AMV Reverse Transcriptase\*1 0.5 ul

Oligo dT-Adaptor primer 1 ul

RNA 样品 4.25 ul

Total 10 ul

###### （2）反应条件：

42℃30min, 1 Cycle

99℃5min

8℃forever

###### （3）所得cDNA可以直接进行PCR反应或-20℃保存备用。

### 2.3 引物设计

根据GenBank中小鼠的IL-1β、IL-12、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-6核苷酸序列，进行同源性比较分析，选择保守序列区作为扩增区域，利用BLAST软件程序和Primer 5.0引物设计软件，设计目的基因的实时定量PCR引物，引物由上海生工合成，引物序列见表2-1。

### 2.4 目的片段的PCR扩增

###### （1）反应体系如下：

10×PCR Buffer 2.5ul

DNTP Mixture 2 ul

cDNA 1ul

上游引物（10pmol）1ul

下游引物（10pmol）1ul

rTaq 酶 0.2ul

水 17.3ul

Total 25ul

###### （2）反应程序如下：

95℃ 5min

95℃ 15s

62℃ 45s

72℃32s，2-4共30个循环

72℃5min

8℃forever

###### （3）取PCR产物5ul，经1%琼脂糖凝胶电泳检测。

表2-1 Real-time PCR 所用引物序列及产物片段长度

Table 2-1 Sequence and product of the primers used in real-time quantitative RT-PCR

| Gens | Direction | Sequence | Product(bp) |
| --- | --- | --- | --- |
| IL-1β | Forward | AACCTGCTGGTGTGTGACGTTC | 78 |
|  | Reverse | CAGCACGAGGCTTTTTTGTTGT |  |
| IL-12 | Forward | CAGAAAGGTGCGTTCCTCGT | 122 |
|  | Reverse | GGAACACATGCCCACTTGCT |  |
| IFN-γ | Forward | CCATCGGCTGACCTAGAGAA | 122 |
|  | Reverse | GATGCAGTGTGTAGCGTTCA |  |
| TNF-α | Forward | CCGATTTGCTATCTCATAC | 196 |
|  | Reverse | CTCCGCAAAGTCTAAGTA |  |
|  | Probe | (FAM) AAGTCAACCTCCTCTCTGCCG (Eclipse) | |
| IL-4 | Forward | GGTCTCAACCCCCAGCTAGT | 102 |
|  | Reverse | GCCGATGATCTCTCTCAAGTGAT |  |
| IL-6 | Forward | CTGCAAGAGACTTCCATCCAG | 131 |
|  | Reverse | AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG |  |

### 2.5 质粒标准品制备

#### 2.5.1 PCR产物胶回收

在1%琼脂糖凝胶上切下目的条带，用Axygen公司的DNA胶回收试剂盒对

PCR产物进行纯化回收，具体操作如下：

（1）切取目的片段的琼脂糖胶，放于事先称重的1.5ml离心管中，进行称重，计算出胶块的重量；

（2）按1: 3加入溶液Buffer DE-A，在75℃水浴中10min，其间震荡2-3次，到胶完全溶化即可；

（3）加入一个胶体积的异丙醇，轻轻混匀，加入0.5个Buffer DE-A体积的Buffer DE-B，混合均匀；

（4）将混合溶液转移到DNA制备管中，12000rpm离心1min，弃掉滤液；

（5）加入500ul Buffer W1, 12000rpm离心30s，弃掉滤液；

（6）加入700ul Buffer W2, 12000rpm离心30s，弃掉滤液，重复一次；

（7）将吸附柱重新放入收集管中，12000rpm离心2min，尽量除去漂洗液；

（8）将吸附柱放于一个新的离心管中，向吸附柱中央加入30ul洗脱液，室温静止

2min, 12000rpm离心2min，收集DNA溶液。

#### 2.5.2 连接反应

连接反应按照PMD 18-T载体试剂盒说明书进行如下：取1.5ml离心管加入以下成分：

PCR 产物 4.5ul

Solution I 5ul

PMD 18-T 0.5ul

Total 10ul

以上组分离心混匀，16℃水浴，连接过夜，-20℃保存备用。

#### 2.5.3 连接产物转化DH5α感受态

（1）从-80℃中冰箱取出一支DH5α感受态细胞，置于冰上完全融化；

（2）加入连接产物，动作轻缓混匀，冰浴30min；

（3）在42℃水浴中热激90s，迅速置于冰上2-5min；

（4）加入800μl无抗LB培养基，37℃，180-200rpm摇床培养45min-1.5h，使细胞充分复苏并表达抗性；

（5）产物取200-500ul，均匀涂布于LB平板上，37℃培养10-12h至菌落出现，进行菌落鉴定，或置于4℃备用。

#### 2.5.4 PCR鉴定重组质粒

（1）挑取单菌落（2-5个），在Amp抗性的LB平板上划线，37℃培养10-12h。

（2）菌体PCR反应：（反应体系同前）

10×PCR Buffer 2.5ul

DNTP Mixture 2 ul

划线培养的单菌落 用枪头挑取少量菌体上游引物（10pmol） 1ul

下游引物（10pmol）1ul

rTaq 酶 0.2ul

水 17.3ul

Total 25ul

（3）反应程序如下：

95℃ 5min

95℃ 15s

62℃45s

72℃32s，2-4共30个循环

72℃5min

8℃forever

（4）取PCR产物5ul，经1%琼脂糖凝胶电泳检测。

#### 2.5.5 双酶切鉴定重组质粒

取1.5ml离心管加入以下成分：

BamHI 0.5ul

Post I 0.5ul

Buffer 3 2ul

10×BSA 2ul

质粒 15ul

Total 20ul

37℃培养4-12h后，取酶切产物5ul，经1%琼脂糖凝胶电泳检测。

#### 2.5.6 序列测定

（1）挑取一个阳性克隆菌落于LB培养基中，37℃，200rpm培养过夜。

（2）取1ml菌液，送上海生工公司测序，剩余菌液于4℃保存待做质粒提取。

#### 2.5.7 质粒DNA提取

按照Axygen公司质粒提取试剂盒说明书的操作步骤进行如下：

（1）将2ml菌液转移到1.5mL离心管中，12000rpm离心1min，弃上清液；

（2）向菌液沉淀中加入250ul Buffer S1悬浮菌液，漩涡震荡15s；

（3）加入250ul Buffer S2，温和颠倒数次；

（4）加入350ul Buffer S3，立即温和颠倒，充分混匀，12000rpm离心10min；

（5）将上清液吸入2ml制备管中，12000rpm离心1min，弃滤液；

（6）向吸附柱内加入500ul Buffer W1, 12000rpm离心1min，弃滤液；

（7）向吸附柱内加入700ul Buffer W2, 12000rpm离心1min，弃滤液，重复一次；

（8）将吸附柱放入制备管中，12000rpm离心1min；

（9）将吸附柱放入一个新的离心管中，向吸附住中央加入70ul灭菌水，室温静止

2min, 12000rpm离心1min；

（10）收集质粒，分装保存于-80℃中备用。

### 2.6 质粒纯度测定

（1）将质粒进行100倍稀释后，用分光光度计测定OD260/280的值，根据其比值判断所提质粒的纯度，比值在1.8左右表明纯度较高。根据测定的质粒的质

量，算出其摩尔浓度，再乘以阿弗加德罗常数（6.02×1023个/ml），可得到所提质粒的浓度，即每微升所含的拷贝数。

（2）OD260/280的比值在1.7-1.9之间说明所得质粒纯度较好，比值低于1.7可能是有蛋白污染，如果高于2.0则说明质粒可能降解，也可能是有RNA污染。

### 2.7 标准曲线的建立

（1）质粒的稀释：将已知浓度的质粒进行倍比稀释，为了避免误差，取10ul质粒进行稀释，加入90ul灭菌双蒸水中充分混匀，以此类推共稀释成108-102这7个浓度梯度。稀释后，每个浓度的质粒分装于-80℃保存。

（2）SYBR Green I染料法反应体系为：

SYBR Premix Ex Taq（2×）10ul

上游引物（10pmol）0.4ul

下游引物（10pmol）0.4ul

DNA模板（cDNA）2ul

ROX II 0.4ul

DEPC 11.8ul

Total 25ul

反应程序如下：

95℃ 3min

95℃ 15s

62℃ 45s

72℃32s, 2-4, 40 Cycles

72℃ 5min

（95℃ 15s

60℃ 1min

95℃ 15s

60℃15s）溶解曲线

（3）Taqman探针法反应体系为：

Premix Ex Taq 12.5ul

上游引物（10pmol）0.5ul

下游引物（10pmol）0.5ul

探针（probe）0.5ul

ROX II 0.5ul

DNA模板（cDNA）2ul

DEPC 8.5ul

Total 25ul

反应程序如下：

95℃30s

95℃5s

60℃34s, 2-3, 40 Cycles

（4）标准曲线以反应的CT值为横坐标，浓度为纵坐标，两者呈线性反比关系，不同浓度的标准品可以制作出一条标准曲线。本研究中得到的标准曲线由荧光定量PCR仪软件（Applied Biosystems 7500 Software v2.0.6）自动生成。

## 3 结果

### 3.1 细胞因子基因片段重组质粒的鉴定

从小鼠脾脏中提取总RNA，经反转录后，用不同特异性引物对目的基因片段进行PCR扩增，通过琼脂糖凝胶电泳检测，获得与预期片段长度相同的特异性扩增产物。然后将PCR产物克隆到PMD18-T载体上，分别进行PCR鉴定及测序，表明获得的阳性重组质粒为目的质粒。结果见图2-1：





(a) IL-1β(b) IL-12



(c) IFN-γ (d) TNF-α



(E) IL-4 (f) IL-6

图2-1 IL-1β、IL-12、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-6基因片段的RT-PCR产物和重组质粒PCR

的鉴定

注：M.100bp ladder marker；1. 基因片段的RT-PCR产物；2。基因片段的重组质粒；3.重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2-1 RT-PCR products of partial gene fragment of IL-1β、IL-12、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-6and identification of recombinant plasmid by PCR

Note: M.100bp ladder marker; 1. RT-PCR products of genes; 2. Recombinant plasmid of gene；

3. Restriction enzyme digestion analysis of recombinant plasmid

### 3.2 细胞因子标准曲线的建立

对重组质粒标准品进行10倍梯度稀释，各浓度的稀释质粒2ul为模板在实时荧光定量PCR仪上扩增后，系统根据荧光值的变化规律，自动生成标准曲线。从回归曲线可以看出，重组质粒各个稀释度的点均落在标准曲线的相应位置上。根据3次重复反应的数值，系统自动生成回归方程。结果表明，所有标准曲线的线性回归分析均存在一个高的相关系数（R2＞0.99）。

#### 3.2.1 IL-1β基因定量标准曲线

图2-2中所示为IL-1β基因实时荧光定量扩增曲线图、溶解曲线图、标准曲线图以及回归方程。







图2-2 IL-1β基因定量标准曲线

注：a. 标准曲线图；b. 扩增曲线图；c. 溶解曲线图

Fig. 2-2 The quantitative PCR standard curve graph of IL-1βgene

Note: a. Standard curve graph; b. Amplification curve graph; c. Melting curve graph

IL-1β基因荧光定量PCR标准曲线以反应的CT值为纵坐标，以浓度为横坐标，两者成线性反比关系。回归方程如下：y = - 3.266x + 38.532，R2=0.995，可见重组质粒各稀释度之间间隔的CT值相同，各个点均能在同一条直线上，大于0.99说明不同浓度质粒的扩增与CT值具有良好的线性关系，误差较小可信度较高。扩增曲线没有异常扩增的现象，融解曲线没有非特异峰的出现，该反应条件和标准曲线可以用于对IL-1β基因进行定量分析。

#### 3.2.2 IL-12基因定量标准曲线

图2-3中所示为IL-12基因实时荧光定量扩增曲线图、溶解曲线图、标准曲线图以及回归方程。





图2-3 IL-12基因定量标准曲线

注：a. 标准曲线图；b. 扩增曲线图；c. 溶解曲线图

Fig. 2-3 The quantitative PCR standard curve graph of IL-12 gene

Note: a. Standard curve graph; b. Amplification curve graph; c. Melting curve graph

IL-12基因荧光定量PCR标准曲线以反应的CT值为纵坐标，以浓度为横坐标，两者成线性反比关系。回归方程如下：y = - 3.244x + 40.8，R2=0.994，可见重组质粒各稀释度之间间隔的CT值相同，各个点均能在同一条直线上，大于0.99说明不同浓度质粒的扩增与CT值具有良好的线性关系，误差较小可信度较高。扩增曲线没有异常扩增的现象，融解曲线没有非特异峰的出现，该反应条件和标准曲线可以用于对IL-12基因进行定量分析。

#### 3.2.3 IFN-γ基因定量标准曲线

图2-4 中所示为IFN-γ基因实时荧光定量扩增曲线图、溶解曲线图、标准曲线

图以及回归方程。





图2-4 IFN-γ基因定量标准曲线

注：a. 标准曲线图；b. 扩增曲线图；c. 溶解曲线图

Fig. 2-4 The quantitative PCR standard curve graph of IFN-γgene

Note: a. Standard curve graph; b. Amplification curve graph; c. Melting curve graph

IFN-γ基因荧光定量PCR标准曲线以反应的CT值为纵坐标，以浓度为横坐标，两者成线性反比关系。回归方程如下：y = - 3.204x + 39.479，R2=0.998，可见重组质粒各稀释度之间间隔的CT值相同，各个点均能在同一条直线上，大于0.99说明不同浓度质粒的扩增与CT值具有良好的线性关系，误差较小可信度较高。扩增曲线没有异常扩增的现象，融解曲线没有非特异峰的出现，该反应条件和标准曲线可以用于对IFN-γ基因进行定量分析。

#### 3.2.4 TNF-α基因定量标准曲线

图2-5 中所示为TNF-α基因实时荧光定量扩增曲线图、标准曲线图以及回归

方程。





图2-5 TNF-α基因定量标准曲线注：a. 标准曲线图；b. 扩增曲线图

Fig. 2-5 The quantitative PCR standard curve graph of TNF-αgene Note: a. Standard curve graph; b. Amplification curve graph

TNF-α基因荧光定量PCR标准曲线以反应的CT值为纵坐标，以浓度为横坐

标，两者成线性反比关系。回归方程如下：y = - 3.382x + 42.587，R2=0.999，可见重组质粒各稀释度之间间隔的CT值相同，各个点均能在同一条直线上，大于0.99说明不同浓度质粒的扩增与CT值具有良好的线性关系，误差较小可信度较高。扩增曲线没有异常扩增的现象，该反应条件和标准曲线可以用于对TNF-α基因进行定量分析。

#### 3.2.5 IL-4基因定量标准曲线

图2-6中所示为IL-4基因实时荧光定量扩增曲线图、溶解曲线图、标准曲线图以及回归方程。





图2-6 IL-4基因定量标准曲线

注：a. 标准曲线图；b. 扩增曲线图；c. 溶解曲线图

Fig. 2-6 The quantitative PCR standard curve graph of IL-4 gene

Note: a. Standard curve graph; b. Amplification curve graph; c. Melting curve graph

IL-4基因荧光定量PCR标准曲线以反应的CT值为纵坐标，以浓度为横坐标，两者成线性反比关系。回归方程如下：y = - 3.317x + 38.705，R2=0.999，可见重组质粒各稀释度之间间隔的CT值相同，各个点均能在同一条直线上，大于0.99说明不同浓度质粒的扩增与CT值具有良好的线性关系，误差较小可信度较高。扩增曲线没有异常扩增的现象，融解曲线没有非特异峰的出现，该反应条件和标准曲线可以用于对IL-4基因进行定量分析。

#### 3.2.6 IL-6基因定量标准曲线

图2-7 中所示为IL-6基因实时荧光定量扩增曲线图、溶解曲线图、标准曲线

图以及回归方程。



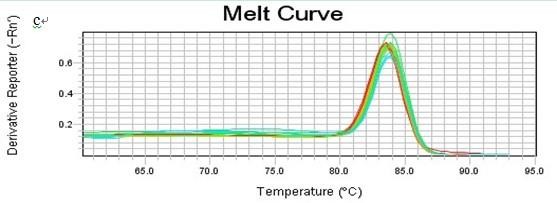
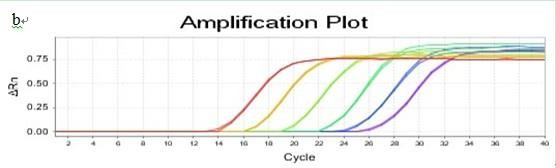


图2-7 IL-6基因定量标准曲线

注：a. 标准曲线图；b. 扩增曲线图；c. 溶解曲线图

Fig. 2-7 The quantitative PCR standard curve graph of IL-6 gene

Note: a. Standard curve graph; b. Amplification curve graph; c. Melting curve graph

IL-6基因荧光定量PCR标准曲线以反应的CT值为纵坐标，以浓度为横坐标，两者成线性反比关系。回归方程如下：y = - 3.233x + 39.792，R2=1，可见重组质粒各稀释度之间间隔的CT值相同，各个点均能在同一条直线上，大于0.99说明不同浓度质粒的扩增与CT值具有良好的线性关系，误差较小可信度较高。扩增曲线没有异常扩增的现象，融解曲线没有非特异峰的出现，该反应条件和标准曲线可以用于对IL-6基因进行定量分析。

## 4 讨论

本实验使用绝对定量的方法对样品进行检测，制备定量的标准品[86]。通过优化引物设计，选取具有少发卡结构，少上下游互补结构，少引物二聚体形成的引物，确保目的基因的特异性扩增。将PCR扩增出的基因片段克隆到PMD18-T载体上，应用试剂盒提取质粒。在绝对定量中要求标准曲线有5个点以上，本实验对质粒

标准品进行10倍梯度稀释，并选择5-7个稀释度进行标准曲线的构建，并且每个

稀释度都做了3次重复，从而确保其可靠性和重复性。

本研究建立了Real-time PCR方法，构建了IL-1β、IL-12、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-6 基因的标准曲线，通过线性回归分析，标准曲线具有较高的相关系数（R2＞

0.99），扩增效率在90%-105%之间，其检测下限达到102拷贝数，且扩增曲线没有异常扩增的现象，融解曲线没有出现非特异峰。说明建立的标准曲线扩增状态良好，能够用于检测小鼠细胞因子的表达，通过mRNA的表达变化可以分析LT蛋白免疫后T细胞产生免疫应答的分子机制，对诊断疾病防治、评价免疫应答等具有重要意义。

在基因表达的研究中，常用的方法有RT-PCR定量、Northern印迹等方法。相对于其它一些基因表达研究方法，Real-time PCR是在PCR定性的基础上发展起来的核算定量技术，具有高灵敏性、准确性、重复性和高通量等特性，广泛用于细胞、体液和组织的微量生物活性蛋白mRNA表达水平的定量分析[87]，并逐步被许多试验研究所应用，有助于疾病的诊断和治疗[88-89]。

# 第二章 LT诱导巨噬细胞中细胞因子动态变化的研究

第二章中已证实LT蛋白处理小鼠后可以提高脾脏组织中细胞因子mRNA的表达量，因此为了进一步验证LT蛋白对小鼠巨噬细胞中细胞因子的激活作用，本实验利用荧光定量PCR方法和液相芯片技术检测LT蛋白佐剂（野生型、突变型）诱导小鼠Ana-1巨噬细胞中细胞因子的变化规律，从而在细胞水平上进一步深化

LT黏膜佐剂作用的分子机制。

## 1 实验材料

### 1.1 主要仪器

ABI 7500 荧光定量 PCR 仪 ABI 公司

PCR 仪 BIO-RAD 公司

琼脂糖凝胶电泳装置BIO-RAD公司

凝胶成像分析系统BIO-RAD公司

低温离心机Sigma公司

分光光度计Eppendorf公司

超净台苏净集团安泰公司

FLEXMAP 3D Merk Millipore公司

### 1.2 主要试剂及试剂盒

SYBR®Premix Ex TaqTM TaKaRa公司

Premix Ex TaqTM(Probe qPCR) TaKaRa公司

DNA marker DL2000 TaKaRa公司

反转录试剂盒TaKaRa公司

总RNA提取试剂盒北京艾德莱生物科技有限公司

小鼠细胞因子液相芯片试剂盒Merk Millipore公司

无水乙醇，异丙醇北京鼎国公司

DEPC 水 Sigma 公司

琼脂糖上海生工生物工程有限公司

Gold view染料赛百胜公司

### 1.3 菌株和细胞

野生型LT和突变型LTRG表达菌种：由本实验室保存，按照唐思静构建LT

双突变体[56]的方法表达纯化蛋白，-70℃保存备用。

Ana-1小鼠巨噬细胞系，购自中国科学院细胞库。

### 1.4 主要试剂配制

#### 1.4.1 0.1%DEPC 水

1ml DEPC加入1000ml三蒸水中，37℃震荡过夜，120℃高压灭菌20min。

#### 1.4.2 75%乙醇

用0.1%DEPC水和新开封的无水乙醇配制75%乙醇，4℃保存备用。

#### 1.4.3 琼脂糖凝胶所用试剂和配制同第一章

#### 1.4.4 PBS

0.2g KH2PO4, 2.9g Na2HPO4·12H2O，0.2g KCl, 8g NaCl加蒸馏水至1000mL，高压灭菌20min。

#### 1.4.5 1%双抗贮存液

100 万单位链霉素，80万单位氨苄青霉素钠加灭菌的双蒸馏水至100mL，用

0.22μm滤膜过滤除菌，分装，-20℃保存备用。

#### 1.4.6 1640培养基

1袋1640粉剂，1.9g NaHCO3，加入1L三蒸水，用HCl调pH值至7.0，定容至1000 mL，用0.22μm滤膜过滤除菌，4℃保存备用。

#### 1.4.7 细胞生长液

90mL 1640, 10mL血清，1mL双抗，用0.22μm滤膜过滤，4℃保存备用。

#### 1.4.8 细胞复苏液

80mL 1640, 20mL血清，1mL双抗，用0.22μm滤膜过滤，4℃保存备用。

## 2 实验方法

### 2.1 细胞复苏

（1）从液氮中取出冻存的Ana-1小鼠巨噬细胞，迅速投入37℃水浴锅中；

（2）待融化后，直接转入盛有4mL细胞复苏液的10mL离心管中，4℃离心10min

（去除二甲基亚砜）；

（3）用5mL细胞复苏液重悬细胞，将其转入细胞培养瓶中，置于37℃，5% CO2

培养箱中，6h内观察细胞状态，换液。

### 2.2 细胞传代

（1）待细胞贴壁后，换细胞培养液，培养36～72h；

（2）使细胞密度达到80%左右时移去细胞瓶中培养液，用PBS洗细胞2次；

（3）加入5ml细胞培养液，用吸管轻轻吹打细胞数次使其彼此分开，然后传代于

2～3个培养瓶中。

### 2.3 Real-time PCR检测不同剂量LTRG对小鼠巨噬细胞中细胞因子的刺激

#### 2.3.1 细胞处理

（1）待细胞满度为80%时，用基础培养基洗2次，加基础培养基至细胞密度为

1.5×10 6/mL；

（2）将细胞分为突变型LTRG组（在细胞培养基中分别加入LTRG至终浓度0.25ug/ml、0.5ug/ml、1ug/ml、10ug/ml，混合均匀）和PBS组（在细胞培养基中加入PBS至终浓度1ug/ml），然后将其分别加入到24孔板中，0.5mL/孔，每个剂量设3个重复，培养至6h；

（3）6h后取出24孔板中的培养基，取上清于-80℃保存备用。

#### 2.3.2 用Trizol悬浮培养基中细胞，并提取细胞RNA

（1）用600ul Trizol悬浮培养基中细胞，在振荡器上震荡1min，使其充分裂解，室温静止10min；

（2）加入300ul氯仿，震荡15s，室温静止10min，4℃，12000rpm离心15min；

（3）加入300ul异丙醇，上下颠倒数次，-20℃放置1-2h，4℃，12000rpm离心15min；

（4）弃上清，加入1ml 75%乙醇，混合均匀，4℃，10000rpm离心15min；

（5）干燥10min，加入20ul DEPC水，充分混匀；

（6）将提取的RNA立即进行反转录或-80℃保存备用。

#### 2.3.3 用Real-time PCR方法检测

检测培养基中的IL-1β、IL-4的mRNA表达量。

（1）根据已建立的标准曲线中所用的质粒浓度，将IL-1β、IL-4的重组质粒10倍梯度稀释成5-7个浓度，以稀释度的质粒标准品作为模板，每个稀释度反应重复3孔，进行PCR扩增，制作标准曲线。

（2）将细胞中提取的总RNA经反转录的cDNA作为模板，按照反应体系加入各组分，进行PCR扩增，每次反应中，每个样本重复3次。为了尽量保证各PCR反应管中模板初始量的相同，首先在反应管中加入模板、SYBR Green Master Mix或Premix Ex Taq Mix、引物和DEPC水混匀后，再分装到各个反应孔中。为了保证实验结果的可靠性，每次反应都要有待测基因的标准曲线。

（3）SYBR Green I染料法反应体系为：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| SYBR Premix Ex Taq（2×） |  | 10ul |
| 上游引物（10pmol） |  | 0.4ul |
| 下游引物（10pmol） |  | 0.4ul |
| DNA 模板（cDNA） |  | 2ul |
| ROX II |  | 0.4ul |
| DEPC |  | 11.8ul |
| Total  反应程序如下： |  | 25ul |
| 95℃ | 3min |  |

95℃ 15s

62℃ 45s

72℃32s, 2-4, 40 Cycles

72℃ 5min

（95℃ 15s

60℃ 1min

95℃ 15s

60℃15s）溶解曲线

（4）Taqman探针法反应体系为：

Premix Ex Taq 12.5ul

上游引物（10pmol）0.5ul

下游引物（10pmol）0.5ul

探针（probe）0.5ul

ROX II 0.5ul

DNA模板（cDNA）2ul

DEPC 8.5ul

Total 25ul

反应程序如下：

95℃30s

95℃5s

60℃34s, 2-3, 40 Cycles

### 2.4 Real-time PCR检测LT蛋白对小鼠巨噬细胞中细胞因子的刺激

（1）待细胞满度为80%时，用基础培养基洗2次，加基础培养基至细胞密度为

1.5×10 6/mL；

（2）将细胞分为野生型LT组、突变型LTRG组和PBS组，在细胞培养基中分别加入各组蛋白至终浓度1ug/ml，混合均匀，然后将其分别加入到24孔板中，0.5mL/孔，每组设3个重复；

（3）分别在2h、4h、6h、12h、24h、36h、48h收集细胞上清液，于-80℃保存备用，用Trizol悬浮培养基中细胞，并提取细胞RNA，方法同2.3.4；

（4）用Real-time PCR方法检测培养基中的IL-1β、IL-12、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-6的mRNA表达量，方法同2.3.3.

### 2.5 Real-time PCR检测LTRG与BSA协同处理对小鼠巨噬细胞中细胞因子的影响

（1）待细胞满度为80%时，用基础培养基洗2 次，加基础培养基至细胞密度为

### 1.5 ×106/mL；

（2）将细胞分为突变型LTRG和BSA组、BSA组，在细胞培养基中分别加入各组蛋白至终浓度1ug/ml，混合均匀，然后将其分别加入到24孔板中，0.5mL/孔，每组设3个重复；

（3）分别在2h、4h、6h、12h、24h、36h、48h收集细胞上清液，于-80℃保存备用，用Trizol悬浮培养基中细胞，并提取细胞RNA，方法同2.3.4；

（4）用Real-time PCR方法检测培养基中的IL-1β、IL-12、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-6的mRNA表达量，方法同2.3.3.

### 2.6 液相芯片检测细胞上清液中细胞因子的变化

#### 2.6.1 材料准备

（1）从-80℃中取突变型LTRG组、PBS组、突变型LTRG和BSA组、BSA组小鼠巨噬细胞培养的上清液，每组在不同时间点各取两只样品，小鼠细胞因子液相芯片试剂盒检测IL-1β、IL-12、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-6的表达量；

（2）分装500ul细胞上清液，4000rpm离心10min，取上清液备用；

（3）试剂盒于使用前4℃平衡30min；

（4）Beads：将所需Beads超声30秒，涡旋一分钟，然后各取出60ul加入Mixing Bottle，剩余体积用Assay Buffer补足3ml，充分混匀；

（5）Quality Controls：用250ul蒸馏水分别溶解Control 1和2，颠倒多次使其充分混匀，静止5-10min，然后分别移入两个试管中；

（6）Standard：用250ul蒸馏水溶解Standard，颠倒多次使其充分混匀，静止5-10min，然后移入试管中，标记为S6。然后再拿5个试管，分别标记为S5/S4/S3/S2/S1，每个管中加200ul Assay Buffer，最后从S6中取出50ul进行梯度稀释；

（7）Wash Buffer: 将10×WB放置室温，使其中盐分充分溶解，30mlWB+270ml

蒸馏水将其配成1×；

（8）Serum Matrix: 往SM中加入2ml Assay Buffer使其充分溶解，静止10min，然后移入试管里。

#### 2.6.2 试验流程

（1）96孔板中每孔加200ul Wash Buffer，室温摇10分钟润洗，然后用vacuum吸去；

（2）分别加25ul①AB到Background

②Standard和Control到各自位置

③AB到样品孔

④Serum Matrix到Background、Standard和Control

⑤Sample到样品孔

⑥Beads到每个孔，4℃避光过夜震荡孵育(16-18h)；

（3）用vacuum吸去，加200ul Wash Buffer洗两遍；

（4）用vacuum吸去，每孔加25ul Detection Antibodies，室温避光摇1h；

（5）直接加25ul SAPE，室温避光摇30min；

（6）用vacuum吸去，加200ul Bash Buffer洗两遍，加150ul Sheath Fluid上机。

### 2.7 数据统计

通过标准曲线可以计算出各个细胞因子的mRNA表达量，通过MILLIPLEX Analyst Detail Report可以直接得到细胞上清液中的蛋白含量，所得数据通过Microsoft Excel 2010处理，用SPSS 16.0软件进行统计分析和显著性分析。

## 3 结果

### 3.1 不同剂量LTRG对小鼠巨噬细胞中细胞因子的影响

#### 3.1.1 小鼠巨噬细胞中IL-1β的mRNA表达

如图4-1所示，不同剂量的突变型LTRG蛋白免疫小鼠巨噬细胞中IL-1β 的

mRNA表达均有不同，在使用1ug/ml剂量时达到峰值（p＜0.01），约为对照组的

12.4倍，而PBS组作为对照，无显著差异（P＞0.05）。



图4-1不同剂量LTRG免疫小鼠巨噬细胞中IL-1β的mRNA表达结果注：p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 4-1 IL-1βmRNA expression results with different doses of LTRG by immunizing with LT the mouse macrophages

Note: p＜0.01(\*\*) indicate a significant difference

#### 3.1.2 小鼠巨噬细胞中IL-4的mRNA表达

如图4-2所示，不同剂量的突变型LTRG蛋白免疫小鼠巨噬细胞中IL-4 的

mRNA表达均有不同，在使用1ug/ml剂量时达到峰值（p＜0.01），约为对照组的

8.9倍，而PBS组作为对照，无显著差异（P＞0.05）。



图4-2 不同剂量LTRG免疫小鼠巨噬细胞中IL-4的mRNA表达结果注：p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 4-2 IL-4 mRNA expression results with different doses of LTRG by immunizing with LT the mouse macrophages

Note: p＜0.01(\*\*) indicate a significant difference

### 3.2 LT蛋白对小鼠巨噬细胞中细胞因子的影响

#### 3.2.1 小鼠巨噬细胞中IL-1β的mRNA表达

如图4-3所示，野生型和突变型LT蛋白免疫小鼠巨噬细胞中IL-1β的mRNA表达水平呈时间依赖性升高，而PBS对照组没有明显变化。野生型LT蛋白在免疫后2h时IL-1β的mRNA表达量达到高峰（p＜0.01），约为对照组的18.1倍，随后表达水平开始下降，6h后恢复正常。突变型LTRG蛋白在免疫后2h开始与对照组相比极显著升高，在4h时IL-1β的mRNA表达水平达到峰值（p＜0.01），约为对照组的7.1倍，后随着培养时间的延长6h后开始下降，12h后恢复正常。PBS组作为对照，无显著差异（P＞0.05）。



图4-3 LT免疫小鼠巨噬细胞中IL-1β的mRNA表达结果注：p＜0.05（\*）为差异显著，p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 4-3 IL-1βmRNA expression results with LT by immunizing the mouse macrophages Note: p＜0.05（\*）were considered significantly difference，p＜0.01（\*\*）indicate a significant

difference

#### 3.2.2 小鼠巨噬细胞中IL-12的mRNA表达

如图4-4所示，野生型和突变型LT蛋白免疫小鼠巨噬细胞中IL-12的mRNA表达水平呈时间依赖性升高，而PBS对照组没有明显变化。野生型LT蛋白在免疫后24h时IL-12的mRNA表达量达到高峰（p＜0.01），约为对照组的959.2倍，随后表达水平开始下降，48h后恢复正常。突变型LTRG蛋白在免疫后36h时IL-12的mRNA表达水平达到峰值（p＜0.01），约为对照组的4838.6倍，后随着培养时间的延长48h后开始下降。PBS组作为对照，无显著差异（P＞0.05）。



图4-4 LT免疫小鼠巨噬细胞中IL-12的mRNA表达结果注：p＜0.05（\*）为差异显著，p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 4-4 IL-12 mRNA expression results withLT by immunizing the mouse macrophages Note: p＜0.05（\*）were considered significantly difference，p＜0.01（\*\*）indicate a significant

difference

#### 3.2.3 小鼠巨噬细胞中IFN-γ的mRNA表达

如图4-5所示，野生型和突变型LT蛋白免疫小鼠巨噬细胞中IFN-γ的mRNA

水平呈时间依赖性升高，而PBS对照组没有明显变化。野生型LT蛋白在免疫后

24h时IFN-γ的mRNA表达量达到高峰（p＜0.01），约为对照组的652.2倍，随后表达水平开始下降，48h后恢复正常。突变型LTRG蛋白在免疫后36h时IFN-γ的mRNA表达水平达到峰值（p＜0.01），约为对照组的2387.7倍，后随着培养时间的延长48h后开始下降。PBS组作为对照，无显著差异（P＞0.05）。



图4-5 LT免疫小鼠巨噬细胞中IFN-γ的mRNA表达结果注：p＜0.05（\*）为差异显著，p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 4-5 IFN-γmRNA expression results with LT by immunizing the mouse macrophages

Note: p＜0.05(\*) were considered significantly difference, p＜0.01(\*\*) indicate a significant difference

#### 3.2.4 小鼠巨噬细胞中TNF-α的mRNA表达

如图4-6所示，野生型和突变型LT蛋白免疫小鼠巨噬细胞中TNF-α的mRNA

水平呈时间依赖性升高，而PBS对照组没有明显变化。野生型LT蛋白在免疫后

2h开始与对照组相比极显著升高，在4h时TNF-α的mRNA表达量达到高峰（p

＜0.01），约为对照组的12.3倍，随后表达水平开始下降，48h后恢复正常。突变型LTRG蛋白在免疫后2h开始与对照组相比极显著升高，在6h时TNF-α的mRNA表达水平达到峰值（p＜0.01），约为对照组的17.9倍，后随着培养时间的延长8h后开始下降，48h后恢复正常。PBS组作为对照，无显著差异（P＞0.05）。



图4-6 LT免疫小鼠巨噬细胞中TNF-α的mRNA表达结果注：p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 4-6 TNF-αmRNA expression results with LT by immunizing the mouse macrophages Note: p＜0.01（\*\*）indicate a significant difference

#### 3.2.5 小鼠巨噬细胞中IL-4的mRNA表达

如图4-7所示，野生型和突变型LT蛋白免疫小鼠巨噬细胞中IL-4的mRNA表达水平呈时间依赖性升高，而PBS对照组没有明显变化。野生型LT蛋白在免疫后24h时IL-4的mRNA表达量达到高峰（p＜0.01），约为对照组的2456.6倍，随后表达水平开始下降，48h后恢复正常。突变型LTRG蛋白在免疫后36h时IL-4的mRNA表达水平达到峰值（p＜0.01），约为对照组的15056.8倍，后随着培养时间的延长48h后开始下降。PBS组作为对照，无显著差异（P＞0.05）。



图4-7 LT免疫小鼠巨噬细胞中IL-4的mRNA表达结果注：p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 4-7 IL-4 mRNA expression results with LT by immunizing the mouse macrophages Note: p＜0.01（\*\*）indicate a significant difference

#### 3.2.6 小鼠巨噬细胞中IL-6的mRNA表达

如图4-8所示，野生型和突变型LT蛋白免疫小鼠巨噬细胞中IL-6的mRNA表达水平呈时间依赖性升高，而PBS对照组没有明显变化。野生型LT蛋白在免疫后12h时IL-6的mRNA表达量达到高峰（p＜0.01），约为对照组的9.8倍，随后表达水平开始下降，36h后恢复正常。突变型LTRG蛋白在免疫后2h开始与对照组相比极显著升高，在24h时IL-6的mRNA表达水平达到峰值（p＜0.01），约为对照组的765.7倍，后随着培养时间的延长36h后开始下降，48h后恢复正常。

PBS组作为对照，无显著差异（P＞0.05）。



图4-8 LT免疫小鼠巨噬细胞中IL-6的mRNA表达结果注：p＜0.05（\*）为差异显著，p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 4-8 IL-6 mRNA expression results with LT by immunizing the mouse macrophages

Note: p＜0.05(\*) were considered significantly difference, p＜0.01(\*\*) indicate a significant difference

### 3.3 LTRG与BSA蛋白共同免疫对小鼠巨噬细胞中细胞因子的影响

#### 3.3.1 小鼠巨噬细胞中IL-1β的mRNA表达

如图4-9所示，LTRG和BSA蛋白共同免疫小鼠巨噬细胞中IL-1β的mRNA表达水平呈时间依赖性升高，而BSA对照组没有明显变化。LTRG和BSA蛋白在免疫后2h开始与对照组相比极显著升高，在12h时IL-1β的mRNA表达量达到高峰（p＜0.01），约为对照组的4.5倍，后随着培养时间的延长24h后开始下降，36h后恢复正常。BSA组作为对照，无显著差异（P＞0.05）。



图4-9 LTRG和BSA免疫小鼠巨噬细胞中IL-1β的mRNA表达结果注：p＜0.05（\*）为差异显著，p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 4-9 IL-1βmRNA expression results with LTRG and BSA by immunizing the mouse macrophages

Note: p＜0.05(\*) were considered significantly difference, p＜0.01(\*\*) indicate a significant

difference

#### 3.3.2 小鼠巨噬细胞中IL-12的mRNA表达

如图4-10所示，LTRG和BSA蛋白共同免疫小鼠巨噬细胞中IL-12的mRNA表达水平呈时间依赖性升高，而BSA对照组没有明显变化。LTRG和BSA蛋白在免疫后2h开始与对照组相比极显著升高，在12h时IL-12的mRNA表达量达到高峰（p＜0.01），约为对照组的10.8倍，后随着培养时间的延长24h后开始下降，

36h后恢复正常。BSA组作为对照，无显著差异（P＞0.05）。



图4-10 LTRG和BSA免疫小鼠巨噬细胞中IL-12的mRNA表达结果注：p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 4-10 IL-12 mRNA expression results with LTRG and BSA by immunizing the mouse macrophages

Note: p＜0.01(\*\*) indicate a significant difference

#### 3.3.3 小鼠巨噬细胞中IFN-γ的mRNA表达

如图4-11所示，LTRG和BSA蛋白共同免疫小鼠巨噬细胞中IFN-γ的mRNA表达水平呈时间依赖性升高，而BSA对照组没有明显变化。LTRG和BSA蛋白在免疫后2h开始与对照组相比极显著升高，在12h时IFN-γ的mRNA表达量达到高峰（p＜0.01），约为对照组的8.1倍，后随着培养时间的延长24h后开始下降，36h后恢复正常。BSA组作为对照，无显著差异（P＞0.05）。



图4-11 LTRG和BSA免疫小鼠巨噬细胞中IFN-γ的mRNA表达结果注：p＜0.05（\*）为差异显著，p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 4-11 IFN-γmRNA expression results with LTRG and BSA by immunizing the mouse macrophages

Note: p＜0.05(\*) were considered significantly difference, p＜0.01(\*\*) indicate a significant difference

#### 3.3.4 小鼠巨噬细胞中TNF-α的mRNA表达

如图4-12所示，LTRG和BSA蛋白共同免疫小鼠巨噬细胞中TNF-α的mRNA表达水平呈时间依赖性升高，而BSA对照组没有明显变化。LTRG和BSA蛋白在免疫后2h开始与对照组相比极显著升高，在8h时TNF-α的mRNA表达量达到高峰（p＜0.01），约为对照组的24.9倍，后随着培养时间的延长12h后开始下降，36h后恢复正常。BSA组作为对照，无显著差异（P＞0.05）。



图4-12 LTRG和BSA免疫小鼠巨噬细胞中TNF-α的mRNA表达结果注：p＜0.05（\*）为差异显著，p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 4-12 TNF-αmRNA expression results with LTRG and BSA by immunizing the mouse macrophages

Note: p＜0.05(\*) were considered significantly difference, p＜0.01(\*\*) indicate a significant

difference

#### 3.3.5 小鼠巨噬细胞中IL-4的mRNA表达

如图4-13所示，LTRG和BSA蛋白共同免疫小鼠巨噬细胞中IL-4的mRNA表达水平呈时间依赖性升高，而BSA对照组没有明显变化。LTRG和BSA蛋白在免疫后2h开始与对照组相比极显著升高，在12h时IL-4的mRNA表达量达到高峰（p＜0.01），约为对照组的4.9倍，后随着培养时间的延长24h后开始下降，

36h后恢复正常。BSA组作为对照，无显著差异（P＞0.05）。



图4-13 LTRG和BSA免疫小鼠巨噬细胞中IL-4的mRNA表达结果注：p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 4-13 IL-4 mRNA expression results with LTRG and BSA by immunizing the mouse macrophages

Note: p＜0.01(\*\*) indicate a significant difference

#### 3.3.6 小鼠巨噬细胞中IL-6的mRNA表达

如图4-14所示，LTRG和BSA蛋白共同免疫小鼠巨噬细胞中IL-6的mRNA表达水平呈时间依赖性升高，而BSA对照组没有明显变化。LTRG和BSA蛋白在免疫后8h开始与对照组相比极显著升高，在24h时IL-6的mRNA表达量达到高峰（p＜0.01），约为对照组的7.4倍，后随着培养时间的延长36h后开始下降。BSA组作为对照，无显著差异（P＞0.05）。



图4-14 LTRG和BSA免疫小鼠巨噬细胞中IL-6的mRNA表达结果注：p＜0.05（\*）为差异显著，p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 4-14 IL-6 mRNA expression results with LTRG and BSA by immunizing the mouse macrophages

Note: p＜0.05(\*) were considered significantly difference, p＜0.01(\*\*) indicate a significant difference

### 3.4 液相芯片技术分析LT对巨噬细胞中细胞因子的影响

#### 3.4.1 小鼠巨嗜细胞上清液中TNF-α的表达

如图4-15所示，可见Standard各稀释度之间间隔值相同，各个点均能在同一条直线上，R2=1，CV值小于20%，说明不同稀释度标准品的扩增具有良好的线性关系，标准曲线没有异常扩增的现象，误差较小可信度较高。



图4-15 TNF-α基因标准曲线

Fig. 4-15 The standard curve graph of TNF-αgene

如图4-16所示，LTRG免疫小鼠巨噬细胞上清液中TNF-α的表达水平呈时间依赖性升高，而PBS对照组没有明显变化。LTRG在免疫后2h开始与对照组相比极显著升高，在36h时TNF-α的表达量达到高峰（p＜0.01），约为对照组的64.3倍，后随着培养时间的延长48h后开始下降。PBS组作为对照，无显著差异（P＞0.05）。



图4-16 LTRG免疫小鼠巨噬细胞上清中TNF-α的表达结果

注：p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 4-16 TNF-αexpression results with LTRG by immunizing the mouse macrophages supernatant Note: p＜0.01（\*\*）indicate a significant difference

如图4-17所示。结果显示，LTRG和BSA蛋白共同免疫小鼠巨噬细胞上清液

中TNF-α的表达水平呈时间依赖性升高，而BSA对照组没有明显变化。LTRG 和

BSA蛋白在免疫后2h开始与对照组相比极显著升高，在24h时TNF-α的表达量达到高峰（p＜0.01），约为对照组的8.9倍，后随着培养时间的延长36h后开始下降。BSA组作为对照，无显著差异（P＞0.05）。



图4-17 LTRG和BSA免疫小鼠巨噬细胞上清液中TNF-α的表达结果注：p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 4-17 TNF-αexpression results with LTRG and BSA by immunizing the mouse macrophages supernatant

Note: p＜0.01(\*\*) indicate a significant difference

#### 3.4.2 小鼠巨嗜细胞上清液中IL-6的表达

如图4-18所示，可见Standard各稀释度之间间隔值相同，各个点均能在同一条直线上，R2=1，CV值小于20%，说明不同稀释度标准品的扩增具有良好的线性关系，标准曲线没有异常扩增的现象，误差较小可信度较高。



图4-18 IL-6基因标准曲线

Fig. 4-18 The standard curve graph of IL-6 gene

如图4-19所示，LTRG免疫小鼠巨噬细胞上清液中IL-6的表达水平呈时间依赖性升高，而PBS对照组没有明显变化。LTRG在免疫后4h开始与对照组相比极显著升高，在48h时IL-6的表达量达到高峰（p＜0.01），约为对照组的159.2倍。PBS组作为对照，无显著差异（P＞0.05）。



图4-19 LTRG免疫小鼠巨噬细胞上清中IL-6的表达结果注：p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 4-19 IL-6 expression results with LTRG by immunizing the mouse macrophages supernatant Note: p＜0.01（\*\*）indicate a significant difference

如图4-20所示，LTRG和BSA蛋白共同免疫小鼠巨噬细胞上清液中IL-6的表

达水平呈时间依赖性升高，而BSA对照组没有明显变化。LTRG和BSA蛋白在免疫后2h开始与对照组相比极显著升高，在24h时IL-6的表达量达到高峰（p＜0.01），约为对照组的252.5倍，后随着培养时间的延长36h后开始下降。BSA组作为对照，无显著差异（P＞0.05）。



图4-20 LTRG和BSA免疫小鼠巨噬细胞上清液中IL-6的表达结果注：p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 4-20 IL-6 expression results with LTRG and BSA by immunizing the mouse macrophages supernatant

Note: p＜0.01(\*\*) indicate a significant difference

## 4 讨论

### 4.1 不同剂量LTRG对巨噬细胞中细胞因子的影响

本实验对LT蛋白免疫的小鼠巨噬细胞中细胞因子mRNA转录水平进行检测，分析了这些细胞因子在巨噬细胞中转录水平的动态变化。用不同剂量的LTRG蛋白处理巨噬细胞，定量检测IL-1β和IL-4表达量的变化。IL-1β和IL-4分别作为典型的Th1型和Th2型细胞因子，用来探索最佳剂量。实验结果显示在使用1ug/ml剂量的LTRG蛋白处理巨噬细胞的免疫效果最好，因此选取这一剂量进行后续试验研究。

### 4.2 LT蛋白对巨噬细胞中细胞因子的影响

在荧光定量PCR检测LT蛋白处理巨噬细胞中细胞因子的mRNA动态变化实验中，野生型LT组和突变型LTRG组免疫的小鼠巨噬细胞中细胞因子mRNA含量总体上随着培养时间的延长均呈现先升高再降低的趋势。野生型LT蛋白免疫小鼠巨噬细胞后，IL-12、IFN-γ、IL-4表达量在24h达到峰值，然后逐渐下降；TNF-α和IL-6的表达量分别在4h和12h达到峰值后下降；而在免疫2h后IL-1β的表达量迅速达到峰值后开始下降。这与LT诱导小鼠脾脏中细胞因子表达结果相类似，但LT可以诱导巨噬细胞中细胞因子更早的产生免疫应答，IL-1β最先，TNF-α 和

IL-6次之。

Moue M等[90]用LT刺激PIE细胞系3h后提高了TLR2、Th1型细胞因子（IL-1、IL-12p35）、Th2型细胞因子（IL-6）和趋化因子的表达。韩冬梅等[91]证实LT处理小鼠子宫后Th1型细胞因子有一定程度的上升，LT处理小鼠巨噬细胞后发现

CD4+T淋巴细胞数目也上升，同时促使机体IL-1β的成熟和释放。本实验结果也显示LT蛋白能迅速上调巨噬细胞中细胞因子的表达，一方面可能是巨噬细胞引发先天免疫的同时介导非特异性急性炎症反应，表达模式识别受体（PRRS），从细菌中识别外源性病原体相关分子模式（PAMPS）来快速提高细胞因子的表达；另一方面可能是LT在诱导细胞免疫过程中主要表达MHC II类抗原，并执行抗原递呈功能，有效的清除凋亡细胞、病原体等，从而诱导细胞因子的高效表达[92]。

突变型LTRG处理巨噬细胞后细胞因子表达量达到峰值的时间与野生型LT相比有不同程度的延迟，这与动物实验相一致。

### 4.3 LTRG和BSA协同作用对巨噬细胞中细胞因子的影响

近年来研究发现粘膜佐剂与抗原协同作用可以增强抗原的免疫原性和免疫应答速度[47]。Chong C等[93]用LTG192作佐剂与死的病毒或细菌协同作用可以增强全身性体液和细胞免疫反应，尤其是Th1免疫反应。Celeste C等[52]证实LTG192与灭活的沙门氏菌联合免疫比单独使用沙门氏菌所产生的体液免疫和细胞免疫水平都高，同时产生高水平的IFN-γ、IL-2和IgG。本实验用突变型LTRG蛋白与BSA协同作用刺激小鼠巨噬细胞，结果其共同处理巨噬细胞后，大多数细胞因子的表达量在免疫后2h开始就与单独使用BSA处理细胞的表达量相比呈极显著差异，在12h达到峰值后随着培养时间的延长逐渐下降。表明双突变体LTRG含有引起

LT特异性抗体应答的大部分优势抗原表位，能有效地启动机体产生局部和全身性免疫应答，还能使T、B细胞产生长期的记忆反应，同时与抗原联合使用可以更早产生免疫反应，提高抗原的免疫应答效果。

### 4.4 液相芯片技术分析LT对巨噬细胞中细胞因子的影响

多功能液相芯片技术，适用于抗原-抗体（蛋白生物标记物）免疫分析、核酸研究、受体配体识别分析等。有机的整合了有色微球、激光技术、流体学，实现了在96孔板的每一个单孔中检测多个指标的研究[94-95]。该平台仅需10-50ul样品量；检测速度快，可达9600测试/小时；检测范围大，最低限可达1pg/ml。

因此本实验选用该检测技术，用小鼠细胞因子液相芯片试剂盒检测LTRG组、

PBS组、突变型LTRG和BSA组、BSA组小鼠巨噬细胞培养的上清液中IL-1、IL-4、IL-6、IL-12、IFN-γ、TNF-α的浓度，只检测出IL-6和TNF-α的浓度。结果显示用LTRG蛋白处理的小鼠巨噬细胞中IL-6的浓度呈时间依赖性增加，在48h达到

峰值，而TNF-α浓度呈先升高再降低的趋势，在36h达到峰值后开始下降；用LTRG蛋白和BSA协同处理的小鼠巨噬细胞中IL-6和TNF-α的浓度均呈现先升高再降低的趋势，均在24h达到最高峰；PBS和BSA为对照组，均无显著差异。

刘志忠等[96]用多功能液相芯片分析仪检测血清中IL-6、IL-8和MIP-1α的浓度显著高于对照组。陶少华等[97]运用多功能液相芯片分析系统证实外周血中Th1型细胞因子IL-2、IL-12、TNF-α和IFN-γ升高，Th2型细胞因子IL-6、IL-10也升高。这与本实验结果相类似，大量文献报道[98-99]IL-6是NF-kB信号通路的重要靶分子，可能受不同信号通路的调节，IL-6的启动子部分含有NF-kB和AP-1等因子的结合部位。IL-6相关的NF-kB信号通路激活后使其浓度升高，表明NF-kB对其转录表达起重要的调控作用[100]。本实验IL-6浓度升高可能与NF-kB激活信号通路有关；TNF-α可以刺激免疫系统，调节机体T、B淋巴细胞功能，产生抗菌、抗病毒作用，激发机体的炎症反应[101-102]，而导致TNF-α浓度升高。

此外，LTRG和BSA共同处理巨噬细胞诱导细胞因子表达量至峰值的时间早于单独使用LTRG组，说明突变型LTRG可以协同抗原促进细胞更早的产生免疫应答，与之前细胞水平的检测结果相一致。

本实验结果与mRNA水平检测结果不尽相同，原因一方面主要可能是不同检测方法（Q-PCR和液相芯片）的灵敏度及系统误差造成，另一方面也可能是细胞因子转录后的翻译过程还受到其他因素的影响，具体调控机制还有待进一步的研究。其他细胞因子的表达量均未检出，可能是由于细胞上清液中分泌的蛋白量较低，低于试剂盒的检测范围。所以后续实验可以采用小鼠血液上清检测免疫后细胞因子的动态变化，因为在血清中蛋白含量较高，检测结果较为准确。

# 第三章 实时定量PCR检测LT诱导小鼠脾脏中细胞因子动态变化

LT具有很强的免疫调节作用，可以刺激机体产生多种细胞因子。细胞因子是一类能在细胞间传递信息、具有免疫调节和效应功能的蛋白质，它由多种细胞产生，在细胞间的相互作用、细胞的增殖分化和效应功能等方面发挥重要作用，是体液免疫应答和细胞免疫应答重要的调节因子。已有根据LT激活免疫功能相关的细胞（Th细胞、B细胞、DC细胞等），促使一些与免疫增强作用相关的细胞因子

（IFN-γ、IL-1β、IL-4等）表达的报道[46]，认为LT是通过不同免疫细胞间的相互作用和细胞因子间的信息传递来实现其免疫增强效果。

为了研究LT蛋白对免疫小鼠体内细胞因子表达水平的影响。通过建立的细胞因子荧光定量PCR方法，对LT滴鼻免疫小鼠脾脏中IL-1β、IL-12、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-6基因的mRNA表达水平进行了检测，探讨LT参与免疫应答的机制。

## 1 实验材料

### 1.1 主要仪器

ABI 7500 荧光定量 PCR 仪 ABI 公司

PCR 仪 BIO-RAD 公司

琼脂糖凝胶电泳装置BIO-RAD公司

凝胶成像分析系统BIO-RAD公司

低温离心机Sigma公司

分光光度计Eppendorf公司

生物安全柜生叉公司

超净台苏净集团安泰公司

### 1.2 主要试剂及试剂盒

SYBR®Premix Ex TaqTM TaKaRa公司

Premix Ex TaqTM(Probe qPCR) TaKaRa公司

DNA marker DL2000 TaKaRa公司

反转录试剂盒TaKaRa公司

总RNA提取试剂盒北京艾德莱生物科技有限公司

无水乙醇，异丙醇北京鼎国公司

DEPC水Sigma公司

琼脂糖上海生工生物工程有限公司

Gold view染料赛百胜公司

### 1.3 菌株和实验动物

野生型LT和突变型LTRG表达菌种：由本实验室保存，按照唐思静构建LT

双突变体[56]的方法表达纯化蛋白，-70℃保存备用。

昆明系小白鼠（6~8 周龄，雌性）由复旦大学医学院实验动物部提供。

### 1.4 主要试剂配制

#### 1.4.1 0.1%DEPC水

同第二章

#### 1.4.2 75%乙醇

同第二章

#### 1.4.3 琼脂糖凝胶所用试剂和配制同第一章

## 2 实验方法

### 2.1 动物试验

实验分为三组，第一组为野生型LT组、第二组为突变型LTRG组、第三组为

PBS组。不同组小鼠通过滴鼻免疫10ug/ml剂量，免疫后在4h、8h、12h、24h、

36h、48h、60h和72h各取3只小鼠断颈处死，无菌解剖取小鼠脾脏组织，称重后分装到灭菌1.5ml离心管中，-80℃超低温冰箱保存，待作细胞因子mRNA表达差异分析。

### 2.2 小鼠脾脏总RNA提取

采用北京艾德莱生物科技有限公司的总RNA提取试剂盒，提取小鼠脾脏中的

RNA，具体步骤如下：

（1）将脾脏组织研磨，取适量组织（20-30mg左右）。加入600ul裂解液，在振荡器上震荡1min，使其充分裂解；

（2）将裂解物13000rpm离心3min，上清液全部移入DNA清除柱上；

（3）立即13000rpm离心60s，保留滤过液；

（4）用微量移液器较精确估计滤过液体积，加入等体积70%乙醇，立即吹打混匀；

（5）将混合物移入一个吸附柱RA中，13000rpm离心30s，弃掉废液；

（6）加入700ul去蛋白液RW1，室温放置1min, 12000rpm离心30s，弃掉废液；

（7）加入500ul漂洗液RW，12000rpm离心30s，弃掉废液。加入500ul漂洗液

RW，重复一遍；

（8）将吸附柱RA，放入一个RNase free离心管中，在吸附膜中间部位加40ul RNase free water，室温放置1min, 12000rpm离心1min；

（9）将提取的RNA立即进行反转录或分装后-80℃保存备用。

### 2.3 RNA浓度和纯度的测定

（1）取1ul RNA，通过分光光度计测定；

（2）读取数值，OD260/280比值在1.8-2.1之间均可用，小于1.8说明含蛋白较多，大于2.2可能RNA有降解；

（3）取RNA产物1ul，用内参基因β-Actin做PCR扩增，其产物为阴性，说明提取的RNA里无DNA污染，可以进行后续试验。

### 2.4 总RNA的反转录反应

采用TaKaRa公司的反转录试剂盒，操作参照AMV反转录酶使用说明书进行。

（1）配置反应液：

MgCl2 2 ul

10×RT Buffer 1 ul

DNTP Mixture 1 ul

RNase Inhibitor 0.25 ul

AMV Reverse Transcriptase\*1 0.5 ul Oligo dT-Adaptor primer 1 ul

RNA 样品 4.25 ul

Total 10 ul

（2）反应条件：

42℃30min, 1 Cycle

99℃5min

8℃forever

（3）所得cDNA可以直接进行PCR反应或-20℃保存备用。

### 2.5 所用引物和质粒

同第一章

### 2.6 Real-time PCR反应

方法同第二章2.3.3

### 2.7 数据统计

通过标准曲线可以计算出各个细胞因子的mRNA表达量，所得数据通过

Microsoft Excel 2010处理，用SPSS 16.0软件进行统计分析和显著性分析。

## 3 结果

### 3.1 LT蛋白免疫后小鼠脾脏中IL-1β表达量变化

如图3-1所示，野生型和突变型LT蛋白免疫小鼠脾脏中IL-1β的mRNA水平呈时间依赖性升高，而PBS对照组没有明显变化。野生型LT蛋白在免疫后12h开始与对照组相比极显著升高，在48h时IL-1β的mRNA表达量达到高峰（p＜

0.01），约为对照组的4.8倍，随后表达水平开始下降。突变型LTRG蛋白在免疫后12h开始与对照组相比极显著升高，在免疫后60h时IL-1β的mRNA表达水平达到峰值（p＜0.01），约为对照组的4.5倍，后随着培养时间的延长72h后开始下降。PBS组为对照，无显著差异（P> 0.05）。



图3-1 LT免疫小鼠脾脏中IL-1β的mRNA表达结果

注：p＜0.05（\*）为差异显著，p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 3-1 IL-1βmRNA expression results with LT by immunizing the spleen of mice

Note: p＜0.05(\*) were considered significantly difference, p＜0.01(\*\*) indicate a significant difference

3.2 LT蛋白免疫后小鼠脾脏中IL-12表达量变化

如图3-2所示，野生型和突变型LT蛋白免疫小鼠脾脏中IL-12的mRNA水平呈时间依赖性升高，而PBS对照组没有明显变化。野生型LT蛋白在免疫后12h开始与对照组相比极显著升高，在48h时IL-12的mRNA表达量达到高峰（p＜

0.01），约为对照组的22.7倍，随后表达水平开始下降。突变型LTRG蛋白在免疫后8h开始与对照组相比极显著升高，在60h时IL-12的mRNA表达水平达到峰值（p＜0.01），约为对照组的35.6倍，后随着培养时间的延长72h后开始下降。

PBS组为对照，无显著差异（P＞0.05）。



图3-2 LT免疫小鼠脾脏中IL-12的mRNA表达结果

注：p＜0.05（\*）为差异显著，p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 3-2 IL-12 mRNA expression results with LT by immunizing the spleen of mice

Note: p＜0.05(\*) were considered significantly difference, p＜0.01(\*\*) indicate a significant difference

### 3.3 LT蛋白免疫后小鼠脾脏中IFN-γ表达量变化

如图3-3所示，野生型和突变型LT蛋白免疫小鼠脾脏中IFN-r的mRNA水平呈时间依赖性升高，而PBS对照组没有明显变化。野生型LT蛋白在免疫后12h开始与对照组相比极显著升高，在48h时IFN-r的mRNA表达量达到高峰（p＜0.01），约为对照组的5.2倍，随后表达水平开始下降。突变型LTRG蛋白在免疫后8h开始与对照组相比极显著升高，在60h时IFN-r的mRNA表达水平达到峰值

（p＜0.01），约为对照组的16倍，后随着培养时间的延长72h后开始下降。PBS组为对照，无显著差异（P＞0.05）。



图3-3 LT免疫小鼠脾脏中IFN-γ的mRNA表达结果注：p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 3-3 IFN-γmRNA expression results with LT by immunizing the spleen of mice Note: p＜0.01（\*\*）indicate a significant difference

### 3.4 LT蛋白免疫后小鼠脾脏中TNF-α表达量变化

如图3-4所示，野生型和突变型LT蛋白免疫小鼠脾脏中TNF-α的mRNA水平呈时间依赖性升高，而PBS对照组没有明显变化。野生型LT蛋白在免疫后12h开始与对照组相比极显著升高，在48h时TNF-α的mRNA表达量达到高峰（p＜

0.01），约为对照组的7倍，随后表达水平开始下降。突变型LTRG蛋白在免疫后

8h开始与对照组相比极显著升高，在60h时TNF-α的mRNA表达水平达到峰值（p

＜0.01），约为对照组的12倍，后随着培养时间的延长72h后开始下降。PBS组为对照，无显著差异（P＞0.05）。



图3-4 LT免疫小鼠脾脏中TNF-α的mRNA表达结果

注：p＜0.05（\*）为差异显著，p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 3-4 TNF-αmRNA expression results with LT by immunizing the spleen of mice

Note: p＜0.05(\*) were considered significantly difference, p＜0.01(\*\*) indicate a significant difference

### 3.5 LT蛋白免疫后小鼠脾脏中IL-4表达量变化

如图3-5所示，野生型和突变型LT蛋白免疫小鼠脾脏中IL-4的mRNA水平呈时间依赖性升高，而PBS对照组没有明显变化。野生型LT蛋白在免疫后4h开始与对照组相比极显著升高，在48h时IL-4的mRNA表达量达到高峰（p＜0.01），约为对照组的11.3倍，随后表达水平开始下降。突变型LTRG蛋白在免疫后后4h开始与对照组相比极显著升高，在60h时IL-4的mRNA表达水平达到峰值（p＜0.01），约为对照组的14.7倍，后随着培养时间的延长72h后开始下降。PBS组为对照，无显著差异（P＞0.05）。



图3-5 LT免疫小鼠脾脏中IL-4的mRNA表达结果注：p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 3-5 IL-4 mRNA expression results with LT by immunizing the spleen of mice Note: p＜0.01（\*\*）indicate a significant difference

### 3.6 LT蛋白免疫后小鼠脾脏中IL-6表达量变化

如图3-6所示，野生型和突变型LT蛋白免疫小鼠脾脏中IL-6的mRNA水平呈时间依赖性升高，而PBS对照组没有明显变化。野生型LT蛋白在免疫后4h开始与对照组相比极显著升高，在48h时IL-6的mRNA表达量达到高峰（p＜0.01），约为对照组的5.5倍，随后表达水平开始下降。突变型LTRG蛋白在免疫后8h开始与对照组相比极显著升高，在60h时IL-6的mRNA表达水平达到峰值（p＜0.01），约为对照组的14倍，后随着培养时间的延长72h后开始下降。PBS组为对照，无显著差异（P＞0.05）。



图3-6 LT免疫小鼠脾脏中IL-6的mRNA表达结果注：p＜0.01（\*\*）为差异极显著

Fig. 3-6 IL-6 mRNA expression results with LT by immunizing the spleen of mice Note: p＜0.01（\*\*）indicate a significant difference

## 4 讨论

实验结果显示LT蛋白能够上调Th1型细胞因子（IL-1β、IL-12、IFN-γ、TNF-α）和Th2型细胞因子（IL-4和IL-6）的表达。野生型LT在免疫后48h细胞因子的表达量达到峰值，之后开始下降，在免疫后72h除了TNF-α的表达量与对照组无差异外，IL-4、IL-6、IL-12、IFN-γ的表达量都极显著高于对照组，而IL-1β的表达量却显著降低。说明LT滴鼻免疫小鼠后可以刺激机体产生免疫应答，诱导多种细胞因子的表达变化，但各类细胞因子表达变化不尽相同。许多研究表明LT具有良好的佐剂活性可以通过黏膜途径诱导机体产生免疫应答[103-104]，本实验结果同样证实LT能有效诱导机体产生免疫应答作用。

突变型LTRG在免疫后4h开始IL-12、IL-4、IL-6的表达量极显著高与对照组，在8h开始IL-1β、IFN-γ、TNF-α与对照组有极显著差异，而免疫后60h细胞因子的表达量达到峰值后开始下降。说明LTRG蛋白的功能与野生型LT相类似，但因其毒性降低对机体产生刺激的时间有所推迟。Marcel Maier等[105]证实突变型LTRG诱导了较高效价抗体IgG1和IgG2b产生，并且诱导低水平的脾细胞增生和TNF-α的产生。在我们的研究中，LTRG蛋白刺激细胞因子产生免疫应答的时间有所延迟，可能是由于其诱导高水平抗体的产生，从而阻止黏膜病原体的侵入、中和毒素而抑制免疫应答的产生[106]。

IL-1β和IL-12主要作用于T细胞能促进T细胞的增殖和分化。Maria A等[107]用OVA和LTB滴鼻免疫小鼠，能增强T细胞分化和全身免疫反应，提高了特异性免疫球蛋白G1抗体的产生。这与本实验结果相似，表明LT蛋白可能是通过诱导IL-1β和IL-12这类细胞因子表达来启动机体T细胞产生局部和全身性免疫反应。IFN-γ主要介导细胞免疫和局部炎症反应有关的免疫应答，促进抗体的产生[63-64]；TNF-α除了具有杀伤肿瘤细胞外，还有免疫调节、参与发热和炎症反应等作用。Tran DQ等[108]证明LTG192能促进Th1极化、IgG2a和TNF-α水平的上升。Baudner

C和Hiroki T[109-110]证明LT可以诱导局部粘膜产生分泌性IgA(sIgA)和IgG等保护性抗体，诱导粘膜CTL反应，并且产生分泌IFN-γ的CD4+T细胞。本实验结果也说明LT通过诱导细胞免疫促进抗体的产生，刺激高水平炎性因子的分泌，从而保护机体免于病原体侵犯达到保护作用[111]。

Th2型细胞因子IL-4和IL-6主要参与体液免疫应答[112]。IL-6具有多种免疫调节功能，能够调节免疫应答[113]。IL-4能够激活B细胞产生IgE，同时抑制Th1型细胞因子的产生和Th1细胞的功能[114]。IL-10通过选择性抑制IFN-γ、IL-2、TNF-a等Th1型细胞因子的合成，降低NK细胞、巨噬细胞活性，降低淋巴毒素作用，使细胞免疫功能下降，从而增强了机体的免疫耐受[115]。本研究结果显示LT蛋白免疫后IL-4和IL-6的表达量的变化趋势跟Th1型细胞因子类似，也呈先升高再降低的趋势，但没有得到Th2型细胞因子的上调有抑制Th1型细胞因子表达的现象。韩冬梅等[91]证明LT处理小鼠后Th1型细胞因子有一定程度的上升，而Th2型细胞因子IL-4、IL-10在LT和LTK63处理组均没有明显变化，致使Thl与Th2型细胞因子的平衡偏向Th1型。这与本实验结果相似，本研究发现LT免疫小鼠后能同时上调Th1型和Th2型免疫反应，这可能是由于CD4+T细胞受到共刺激分子信号和来自抗原提呈细胞的抗原信号作用后，影响Thl/Th2增殖和分化，而Th1型细胞因子未抑制Th2型细胞因子的表达可能受到抗原类型、遗传因素、剂量、抗原进入体内的途径以及有无佐剂等影响，且微环境中细胞因子的类型是Th细胞分化为Thl细胞或Th2细胞的决定因素。目前LT粘膜免疫佐剂作用机制尚不完全清楚，造成LT免疫应答水平差异的原因有待进一步研究。

# 第四章 LTRG感染小鼠后脾脏组织中T淋巴细胞的动态变化

机体的免疫反应水平主要决定于抗原提呈细胞的活化成熟程度，CD3、CD4和CD8分子是表达于动物T淋巴细胞表面的信号转导分子，它们共同参与TCR介导的T细胞活化过程。CD4分子主要表达于外周血和外周淋巴器官中辅助性T细胞的CD4+单阳性和CD4+CD8+双阳性T细胞，某些B细胞也表达少量的CD4分子[116]，其识别MHC II类分子递呈的抗原。CD8分子表达在细胞毒性T淋巴细胞、抑止性T细胞和自然杀伤性细胞表面[117]，它能识别MHC I类分子递呈的抗原。为了探讨LT诱导小鼠机体免疫的途径，通过流式细胞术检测LT蛋白免疫后小鼠脾脏组织中CD4+及CD8+阳性T淋巴细胞的变化，来探讨LT蛋白对小鼠细胞免疫应答功能的影响。

## 1 实验材料

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1.1 | 主要仪器  FC500 流式细胞仪 | Beckman 公司 |
|  | 低温离心机 | Sigma 公司 |
|  | 生物安全柜 | 生叉公司 |
| 1.2 | 倒置显微镜  1.2 主要试剂 | Nikon 公司 |
|  | 流式细胞术所用抗体 | 达科为公司 |
|  | 小鼠淋巴细胞分离液 | 达科为公司 |
|  | 尼龙筛网 | 达科为公司 |
| 1.3 | 菌株和实验动物 |  |

野生型LT和突变型LTRG表达菌种：由本实验室保存，按照唐思静构建LT

双突变体[56]的方法表达纯化蛋白，-70℃保存备用。

昆明系小白鼠（6~8 周龄，雌性）由复旦大学医学院实验动物部提供。

### 1.4 主要试剂配制

#### 1.4.1 75%乙醇

同第二章

#### 1.4.2 PBS

同第三章

1.4.31640培养基同第二章

## 2 实验方法

### 2.1 动物试验

实验分三组，第一组为野生型LT组、第二组为突变型LTRG组、第三组为

PBS组。不同组小鼠通过滴鼻免疫10ug/ml剂量，免疫后在48h每组取3只小鼠拉颈处死，无菌解剖取小鼠脾脏组织，用作制备淋巴细胞悬液。

### 2.2 脾脏淋巴细胞悬液制备

（1）将上述实验小鼠断颈处死后，浸于75%乙醇中，无菌取出小鼠脾脏组织；

（2）在玻璃培养皿中加入5ml EZ-sepTM Mouse 1×淋巴细胞分离液，将脾脏组织放在200目的尼龙筛网上，用注射器芯进行研磨后；

（3）把悬有脾脏细胞的分离液转移到10ml离心管中，覆盖200-500ul的1640培养基，3500rpm离心30min；

（4）离心管液体会出现分层，吸出淋巴细胞（白色中间层为淋巴细胞层），加入10ml 1640培养基终止，颠倒洗涤，1800rpm离心10min，弃上清，重悬沉淀，进行细胞计数。

### 2.3 细胞计数

（1）用75%的乙醇浸泡红细胞计数板和盖玻片，擦镜纸轻轻擦干；

（2）将盖玻片盖在计数板上，细胞计数板平放置于显微镜台上，从计数板边缘轻轻滴加细胞悬液，使之充满计数板和盖玻片之间的空隙；

（3）在显微镜下进行细胞计数，根据细胞数量调整细胞浓度达到106个/ml。

### 2.4 细胞表面染色

（1）单细胞悬液的制备：将2×106的细胞放入1.5ml的离心管中，2000rpm离心

5min，弃上清，加入PBS缓冲液50ul悬浮细胞；

（2）细胞与荧光抗体结合：加入适量荧光抗体（参考说明书），混匀，4℃，避光孵育20min，加入2-4ml PBS, 2000rpm离心5min，弃上清；

（3）上样前处理：用300-400ul PBS重悬细胞，准备进行流式细胞仪检测和分析。

### 2.5 数据统计

所得数据通过Microsoft Excel 2010处理，用SPSS 16.0软件进行统计分析和显著性分析。

## 3 结果

### 3.1 LT免疫小鼠脾脏组织中CD3+阳性T淋巴细胞的动态变化

LT免疫小鼠后，用anti-mouse CD3-FITC抗体对小鼠脾脏中CD3+阳性T淋巴细胞的动态变化进行了测定，如图5-1所示。结果显示，野生型和突变型LT蛋白免疫小鼠脾脏组织后CD3+阳性T淋巴细胞的比例相比对照组显著升高。野生型LT蛋白免疫小鼠脾脏组织后CD3+T细胞值为10.38%，与对照组相比提高4.38%。突变型LTRG蛋白免疫后CD3+T细胞值为22.29%，与对照组相比提高16.29%. PBS组作为对照，无显著差异（P＞0.05），本实验为三次重复。







图5-1 LT免疫小鼠脾脏中CD3+表达量

注：a. 野生型LT组；b. 突变型LTRG组；c. PBS对照组

Fig. 5-1 CD3+ expression results with LT by immunizing the spleen of mice Note: a. wild LT group；b. mutant LTRG group；c. PBS control group

### 3.2 LT免疫小鼠脾脏组织中CD4+阳性T淋巴细胞的动态变化

LT免疫小鼠后，用anti-mouse CD4-PECY5抗体对小鼠脾脏中CD4+阳性T淋巴细胞的动态变化进行了测定，如图5-2所示。结果显示，野生型和突变型LT蛋白免疫小鼠脾脏组织后CD4+阳性T淋巴细胞的比例相比对照组显著升高。野生型LT蛋白免疫小鼠脾脏组织后CD4+T细胞值为8.34%，与对照组相比提高4.59%。突变型LTRG蛋白免疫后CD4+T细胞值为17.88%，与对照组相比提高14.13%。

PBS组作为对照，无显著差异（P＞0.05），本实验为三次重复。



图5-2 LT免疫小鼠脾脏中CD4+表达量

注：a. 野生型LT组；b. 突变型LTRG组；c. PBS对照组

Fig. 5-2 CD4+ expression results with LT by immunizing the spleen of mice Note: a. wild LT group；b. mutant LTRG group；c. PBS control group

### 3.3 LT免疫小鼠脾脏组织中CD8+阳性T淋巴细胞的动态变化

LT免疫小鼠后，用anti-mouse CD8-PE抗体对小鼠脾脏中CD8+阳性T淋巴细胞的动态变化进行了测定，如图5-3所示。结果显示，野生型和突变型LT蛋白免疫小鼠脾脏组织后CD8+阳性T淋巴细胞的比例相比对照组显著升高。野生型LT蛋白免疫小鼠脾脏组织后CD8+T细胞值为1.00%，与对照组相比提高0.74%。突变型LTRG蛋白免疫后CD8+T细胞值为1.94%，与对照组相比提高1.68%. PBS组作为对照，无显著差异（P＞0.05），本实验为三次重复。



## 4 讨论

图5-3 LT免疫小鼠脾脏中CD8+表达量

注：a. 野生型LT组；b. 突变型LTRG组；c. PBS对照组

Fig. 5-3 CD8+ expression results with LT by immunizing the spleen of mice Note: a. wild LT group；b. mutant LTRG group；c. PBS control group

各种疾病的转归与细胞免疫功能密切相关，尤其与T淋巴细胞功能相关。T淋巴细胞不仅具有直接免疫效应功能，同时还可以产生多种细胞因子及粘附分子。T淋巴细胞依赖于T淋巴细胞之间、T淋巴细胞与靶细胞之间以及T淋巴细胞与抗原呈递细胞（APC）之间通过细胞表面分子的接触来识别本身活性及发挥效应功能[118]。

本试验结果显示，野生型LT和突变型LTRG蛋白免疫小鼠后脾脏组织中CD4+和CD8+T淋巴细胞比例相比对照组显著提高；其中LTRG免疫后CD4+T淋巴细胞相比对照组大幅度提高14.13%, CD8+T淋巴细胞仅提高1.68%；而野生型LT蛋白免疫后CD4+T淋巴细胞与对照组相比提高4.59%, CD8+T淋巴细胞提高0.74%。

说明LT对T淋巴细胞具有增强作用，增强其诱导同源性T淋巴细胞的分泌。

徐曼等[119]用重组大肠杆菌疫苗E. coli能明显增强其诱导同源CD4+T和CD8+T效应细胞克隆性增殖和分泌IL-2或IFN-γ。Beigon A. S. B等[120]证实突变型LTRG可以增强Th表位产生抗原特异性CD4+T细胞反应。Nashar TO等[121]在体外对LT免疫的小鼠进行分析，说明LT能显著改变淋巴细胞亚类的分布。大量研究表明CD8+CTL介导的细胞免疫是人和动物机体抗胞内寄生菌、病毒、某些真菌感染和抗肿瘤免疫的主要机制，CD4+Th细胞通过诱导CTL及B细胞增殖分化为效应细胞而在免疫应答过程中起关键性调节作用。已发现许多病原微生物等致病因子对T细胞亚群的损伤或功能影响可造成机体的免疫抑制现象，具有Th表位和CTL表位的疫苗能诱导机体产生有效的保护性免疫应答[122]。以上研究与本实验结果相似，说明LT免疫小鼠后可能刺激T淋巴细胞介导的细胞免疫在感染中发挥重要的作用，其中CD4+和CD8+阳性T淋巴细胞通过清除感染细胞的细胞毒性功能，促使效应T细胞增殖或分泌具有抗病毒特性的细胞因子，同时产生抗原特异性反应，从而诱导机体产生保护性免疫作用。在LT免疫后小鼠脾脏组织中抗原的出现伴随着T淋巴细胞的浸润，分泌IgM+的B淋巴细胞急剧减少，免疫球蛋白的水平也降低[123]。脾脏组织中T淋巴细胞增强了MHC-II和IL-2受体的表达，同时提高了细胞因子的表达，例如IFN-γ和IL-6等[124]，从而使CD4+和CD8+T淋巴细胞比例显著提高。

因此，深入研究T细胞亚群在生理、病理和免疫条件下的功能状态、变化规律和组织分布，将为揭示传染病的致病与免疫机理以及研制安全高效疫苗提供重要的理论指导和评价依据。

### 全文总结

### 1、 建立了小鼠IL-1β、IL-12、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-6细胞因子的Real-time PCR

检测方法。

2、应用荧光定量PCR方法分析了LT蛋白刺激小鼠巨噬细胞后，细胞内IL-1β、IL-12、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-6细胞因子的变化趋势，显示突变型LTRG作为黏膜佐剂在毒性降低的同时刺激细胞因子产生免疫应答的时间有所延迟，而LTRG与BSA共同免疫小鼠巨噬细胞后，与单独使用BSA组相比极显著升高

（p＜0.01），显示双突变体良好的黏膜佐剂活性，并且可以协同BSA作用显著增强巨噬细胞的免疫效果。

3、采用多功能液相芯片技术分析了LT对巨噬细胞上清中细胞因子的影响，结果显示LTRG蛋白处理后TNF-α和IL-6的浓度分别在36h和48h达到最大值，与PBS对照组差异极显著（p＜0.01）；LTRG与BSA共免疫后TNF-α和IL-6的浓度在24h达到最大值，与BSA对照组差异极显著（p＜0.01）。说明LT可以提高蛋白中细胞因子的含量。

4、分析了LT蛋白对小鼠活体免疫的影响，结果显示野生型LT和突变型LTRG蛋白组分别在免疫后48h和60h左右了，IL-1β、IL-12、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-6细胞因子mRNA的表达量达到最大值，与对照组差异极显著（p＜0.01）。

5、流式细胞术分析LT蛋白免疫小鼠脾脏T淋巴细胞亚群CD4+和CD8+变化，野生型LT和突变型LTRG蛋白免疫后CD4+和CD8+T淋巴细胞的比例相比对照组显著提高。证明了T淋巴细胞通过清除感染细胞的细胞毒性功能，促使效应T细胞增殖或分泌具有抗病毒特性的细胞因子，同时产生抗原特异性反应，从而诱导机体产生免疫增强作用。

参考文献

[1]赵艳敏，刘惠莉，et al. （2008）.大肠杆菌不耐热肠毒素突变体的表达及活性研究.

中国预防兽医学报（1）：30-34.

[2]冯强，蔡绍皙，杨珺，等.大肠杆菌不耐热肠毒素的表达及纯化保存策略[J].生物工程学报，2003,19(5)：532-537.

[3] Douce G, GIANNELLI V, PIZZA M, et al. Genetically detoxifled mutants of heat-labile enterotoxin from Escherichia coli are able to act oral adjuvants[J]. InfectImmun, 1999, (9): 4400- 4406.

[4]陆承平.兽医微生物学（第三版）[M].北京：农业出版社,2001。

[5]王嘉福，冉雪琴，叶在荣，等.猪大肠杆菌热敏性肠毒素A亚基基因的克隆及核苷酸序列分析[J].畜牧兽医学报，1997,28(6)：517-523.

[6]王嘉福冉雪琴，叶在荣，等.猪大肠杆菌热敏性肠毒素B亚基基因的克隆及核苷酸序列分析[J].畜牧兽医学报，1998,29(3)：261-266.

[7]程新波，陈添弥，马贤凯，等.人毒素源性大肠杆菌热敏毒素基因的克隆和表达[J]. 生物工程学报，1989, 5: 19-23.

[8] Jesse J G, Lucia C R, Elly C, et al. Role of Receptor Binding in Toxicity, Immunogenicity, and Adjuvanticity of Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxin[J]. Infection and Immunity, 1997,65(12):4943-4950.

[9]张雪寒，何孔旺，张书霞.产肠毒素性大肠杆菌肠毒素的研究概况[J].动物医学进

展,2003,24(3): 38-40.

[10] Komase K. AB011677 Escherichia coli genes for heat-labile enterotoxin A subunit and B subunit, complete cds. [gi:3062900].

[11] Sixma TK, Pronk SE, Kalk KH, et al. Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin form E. coli[J] Nature,1991:351,371-377.

[12] Sixma TK, Pronk SE, Kalk KH, et al. Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from E. coli [J]. Nature, 1991, 351:371–377.

[13] Williams NA, Hirst TR, and Nashar TO. Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic[J]. Immunology Today, 1999, 20(2):95-101.

[14] Williams NA, Hirst TR, and Nashar TO. Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic[J]. Immunology Today,1999,20(2):

95-101.

[15] Jacob CO, Leitner M, Zamir A, et al. Priming immunization against cholera toxin and E. coliheat-labile toxin by a cholera toxin short peptide-beta-galactosidase hybrid synthesized in E. coli[J] EMBO J,1985,4(12):3339-3343.

[16] Iida T, Tsuji T, Honda T, et al, A single amion acid substitution in B subunit of Esherichia coli enterotoxin affects its oligomer formation[J]. J. Biol. Chem.,1989. 264(24):14065-14070.

[17] Kabsch W, Sander C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. Biopolymers,1983,22(12):2577- 2637.

[18] Janin J, Miller S, Chothia C. Surface subunit interfaces and interior of oligomeric proteins[J]. J. Mol. Biol.,1988,204(1):155-164.

[19] Goins B, Freire E. Thermal stability and intersubunit interactions of cholera toxin in solution and in association with its cell-surface receptor ganglioside GM1, Biochemistry, 1988, 27(6):2046-2052.

[20]程芳.大肠埃希菌不耐热肠毒素作为新型粘膜佐剂的研究进展[J]，国外医学：

微生物学分册，2000, 23:30-32.

[21] Hofstra H, Witholt B. Heat-labile enterotoxin in Escherichia coli. Kinetics of association of subunits into periplasmic holotoxin[J]. J. Biol. Chem.1985,260(29): 16037-16044

[22] Moss J, Vaughan M. ADP-ribosylation of guanyl nucleotide-binding regulatory proteins by bacterial toxins[J]. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1988, 61:303-379.

[23] van Heyningen S. in Current Topics in Membranes and Transport Vol[J]. Academic. New York, 1983, 18: 445-471.

[24] Moss J, Vaughan M. ADP-ribosylation of guanyl nucleotide-binding regulatory proteins by bacterial toxins[J]. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.,1988,61:303- 379

[25] Van Heyningen S. Current Topics in Membranes and Transport[J]. Academic. New York,1983,18:445-471.

[26] Tsuji T, Honda T, Miwatani T, et al. Analysis of receptor-binding site in Escherichia coli enterotoxin. [J]. Biol Chem, 1985, 260(14): 8552-8558.

[27] Fukuta S, Magnani JL, Twiddy EM, et al. Comparison of the carbohydrate-binding

Specificities of cholera toxin and Escherichia coli heat-labile enterotoxins LTh-I, LT-IIa, and LT-IIb [J]. Infect Immun. 1988, 56(7): 1748-53.

[28] Holmgren J, Fredman P, Lindblad M, et al. Rabbit intestinal glycoprotein receptor for Escherichia coli heat-labile enterotoxin lacking affinity for cholera toxin[J]. Infect Immun., 1982, 38 (2): 424-433.

[29] Tsuji T, Inoue T, Miyama A, Noda M. Glutamic acid-112 of the A subunit of heat-labile enterotoxin from enterotoxigenic Escherichia coli is important for ADP-ribosyltransferase activity[J]. FEBS Lett., 1991, 291(2): 319-321.

[30] Tsai SC, Noda M, Adamik R, et al. Stimulation of choleragen enzymatic activities by GTP and two soluble proteins purified from bovine brain [J]. Biol Chem, 1988, 263(4): 1768-1772.

[31] Burnette WN, Mar VL, Platler BW, et al. Site-specific mutagenesis of the catalytic subunit of cholera toxin: substituting lysine for arginine 7 causes loss of activity[J]. Infect. Immun.,1991, 59(11):4266-4270.

[32] Lobet Y, Cluff CW, Cieplak W Jr. Effect of site-directed mutagenic alterations on ADP-ribosyltransferase activity of the A subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. [J]. Infect. Immun.,1991,59(9):2870-2879

[33] Tsuji T, Inoue T, Miyama A, et al. A single amino acid substitution in the A subunit of Escherichia coli enterotoxin results in a loss of its toxic activity[J]. J. Biol. Chem.,1990, 265(36):22520-22525.

[34] Tsuji T, Inoue T, Miyama A, et al. Glutamic acid-112 of the A subunit of heat-labile enterotoxin from enterotoxigenic Escherichia coli is important for ADP-ribosyltransferase activity[J]. FEBS. Lett.,1991,291(2):319-321.

[35] Pizza M, Giuliani MM, Fontana MR, et al. Mucosal vaccines: non toxin derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants[J]. Vaccines, 2001, 19: 2534-2541.

[36] Zhu X, Kim E, Boman AL, Hodel A, et al. ARF binds the C-terminal region of the Escherichia coli heat-labile toxin (LTA1) and competes for the binding of LTA2. Biochemistry [J]. 2001, 40(15):4560-4568.

[37]冯强，蔡绍皙，杨珺大肠杆菌不耐热肠毒素的表达及其纯化保存策略[J].生物

工程学报-2003, 5, 532-537.

[38]鲁东水，毛旭虎，吴超，邹全明大肠杆菌不耐热肠毒素B亚单位融合表达载体的构建及应用其纯化保存策略[J].第三军医大学学报-2003, 14: 1275-1277.

[39]张小飞，杨倩.粘膜免疫佐剂的研究进展[J].免疫学杂志，2004,20(3)：S62-S65.

[40] Tumpeya TM, Clements JD, Katza JM. Mucosal vaccination protects mice against influenza a heterosubtypic challenge[J]. International Congress Series,2001, (1219): 985-992.

[41] Komase K. AB011677 Escherichia coli genes for heat-labile enterotoxin A subunit and B subunit[J]. completecds[gi:3062900].

[42] Nashar TO, Webb HM, Eaglestone S, et al. Potent immunogenicity of the B subunits of Escherichia coli heat-labile enterotoxin: receptor binding is essential and induces differential modulation of lymphocyte subsets[J]. Proc Natl Acad Sci USA., 1996, 93(1): 226-230.

[43] Burnette WN, Mar VL, Platler BW, et al. Site-specific mutagenesis of the catalytic subunit of cholera toxin: substituting lysine for arginine 7 causes loss of activity[J]. Infect. Immun., 1991,59(11):4266-4270.

[44]张玲华， 邝哲师， 田兴ft. 黏膜免疫佐剂研究进展[J]. 生物技术通讯, 2006，

17(6): 957-960.

[45]李忠明主编，当代新疫苗[M].高等教育出版社2000, 170-181

[46]付百年，王敏文流感疫苗的粘膜免疫中国生物制品学杂志-2003, 6，

[47] Haan D, Holtrop, Verweij, et al. Mucosal immunogenicity and adjuvant activity of the recombinant A subunit of the Escherichia coli heat-labile enterotoxin [J]. Immunology, 2001, 10, 1365-2567.

[48] Elly C, Lucia C, John D, et al. The role of cAMP in mucosal adjuvanticity of Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LT) [J]. Vaccine, 1999, 18(1-2): 38–49.

[49] Thelin O, Heinen E, Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection[J]. toxicology, 2003,185(3):179-184.

[50] Tierney R, Brignon A S, Rappuoli R, et al. Transcutaneous immunization with tetanus toxoid and mutants of Escherichia coli heat-labile enterotoxin as adjuvants elicitstrong protective antibody responses[J]. Infect Dis,2003,188(5):753-758.

[51] Lu Xuhua, Clements J D, Katz J M, et al. Mutant Escherichia coli heat-labile enterotoxin [LT(R192G)]enhances protective humoral and cellular immune responses to orrally administered inactivated influenza vaccine[J]. Vaccine,2002, 20(7-8):1019-1029.

[52] Celeste C, Maria F, John D, et al. LT(R192G), a non-toxic mutant of the heat-labile enterotoxin of Escherichia coli, elicits enhanced humoral and cellular immune responses associated with protection against lethal oral challenge with Salmonella

spp[J]. Vaccine,1998,16(7):732-740.

[53] Antoinette B, Hartman, Lillian L, et al. Native and Mutant Forms of Cholera Toxin and Heat-Labile Enterotoxin Effectively Enhance Protective Efficacy of Live At-tenuate and Heat-Killed Shigella Vaccines[J]. Infect Immun,1999,67(11): 5841-5847.

[54] Nicollier J B, Ogier A, Piroth L, et al. Recombinant virus-like particales of a norovirus (genogroupⅡstrain) administered intranasally and orally with mucosal

Adjuvants LT and LT(R192G) in BALB/c mice induce specific humoral and cellular Th1/Th2-like immune responses[J]. Vaccine, 2004, 22(9-10): 1079-1086.

[55] Feng Q, Yang J, Luo P, et al. LT(K63/R72), a new mutant of Escherichia coliheat-labile enterotoxin, exhibits charateristics more similar to LT(K63) than LT(R72)[J]. Acta Biochimioca et Biophysica Sinica,2005,37(2):126-132.

[56]唐思静.大肠杆菌热敏性肠毒素双突变体构建及佐剂功能研究[D]，石河子大

学.2008

[57]李文建，邹全明.粘膜免疫佐剂：肠产毒性大肠杆不耐热肠毒素(LT)研究进展[J]. 免疫学杂志, 2000，(4)：85-87.

[58] Qian D, Weiss A．T cell antigen receptor signal transduction．Curr Opin Cell Biol, 1997, 205-212．

[59]杨汉春动物免疫学．北京：中国农业大学出版社，2003, 109-135

[60]金伯泉．细胞和分子免疫学．北京：科学出版社，2002, 539--606

[61] Le Rond S, Le Maoult JC, reput C, et al. A1loreactive CD4+ and CDB+T cells express the immunotolerant HLA-G molecule in mixed lymphocyte reaction in vivo implications in transplanted patients[J]. Eur J Immunol, 2004, 34(3): 649660.

[62]陈慰峰，医学免疫学[M]，4版，北京：人民卫生出版社，2006: 104

[63]徐岚，张新能，张永凤等.细胞免疫功能的变化与原因不明习惯性流产的关系

[J].中国实用妇科与产科杂志，2006, 22(5): 349351.

[64]陈理明，李晓洁，蔡应木，肝癌肺癌患者射频消融治疗后细胞免疫功能变化，实用医学杂志，2006，22卷，21期：2467．2468

[65]汪东文，马庆久，杜锡林，肝癌患者集束电极射频治疗后T淋巴细胞亚群及slL22R的改变，The Practical Journal of Cancer, July 2001，Vol16，No．4: 348-249

[66]唐铁钢，贺泽文，射频消融对恶性肿瘤患者免疫功能影响，现代肿瘤医学，

2008年4月，第1 6卷第4期：679．681

[67]姚凤球，凌斌.母胎界面免疫微环境的研究进展[J].国外医学妇产科学分册，

2005, 32(5):281-284.

[68] Hill JA, Polgar K, Anderson DJ. T-helper1-type immunity to trophoblast in woman with recurrent spontaneous abotion[J]. JAMA, 1995, 273:1933-1936.

[69] Szekeres-Bartho J, Wegmann TG. A progesterone dependent immuno-modulatory protein alters the Th1/Th2 balance[J]. J Reprod Immunol, 1996, 31: 81-95.

[70] Shaarawy M, Nagui AR. Enhanced expression of cytokines may play a fundamental role in the mechanics of immunologically mediated recurrent spontaneous abortion[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 1997,76(3): 205-11.

[71] Gafter U, Sredni B, Segal J, et al. Suppressed cell-mediated immunity and monocyte and natural killer cell activity following allogeneic immunization of women with spontaneous recurrent abortion[J]. J Clin Immuno1, 1997,17(5): 408-19.

[72]陶莉莉，洪淡华.流产患者外周血肿瘤坏死因子、白细胞介素2受体及T 细

胞亚群的测定[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 1997, 13(3)：151。

[73] Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T Cell subsets: Thl, Th2 and more[J]. Immunol Today, 1996, 17:138-146.

[74] Peinnequin, A., C. Mouret, et al. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. BMC immunology, 2004,5(1): 3.

[75] Le Rond S, Le Maoult JC, reput C, et al. A1loreactive CD4+ and CDB+T cells express the Immunotolerant HLA-G molecule in mixed lymphocyte reaction in vivo implications in transplanted patients[J]. Eur J Immunol, 2004, 34(3): 649660.

[76] Steve B, Zou J, Wang TH, et al. Evolution of interleukin-1β[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2002,13(6):483-502.

[77] Huleihel M, Alllash A, SaPir O, et al. Lipopolysaeeharide differently induces the

Expression of IL-1 in different compartments of normal term and preterm human plaeentae [J]. Eur Cytokine Netw, 2004, 15:30-36.

[78] Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy[J]. Immun Today, 1997, 18: 478-482.

[79] Yui J, Garcia-Lloret M, et al. Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma- interferon against primary human placental trophoblasts[J]. Placenta, 19915(8):819-35.

[80] Bry K, Lappalainen U. Interleukin-4 and transforming growth factor-beta1 modulate theproduction of interleukin-1 receptor antagonist and of prostaglandin E2 bu decidual cells[J]. Am J Obstet Gyneco1, 1994, 70 (4):1194-1203.

[81] Zhang J, Day I N, Byrne C D. A novel medium throughput quantitative competitive PCR technology to simultaneously measure mRNA levels from multiple genes [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(5):20-29.

[82] Tyagi S, Kramer F R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization[J]. Nature biotechnology, 1996, 14(3): 303-308.

[83] Kutyavin I. DETECTION OF NUCLEIC ACIDS BY OLIGONUCLEOTIDE PROBES CLEAVED IN PRESENCE OF ENDONUCLEASE V: U. S. Patent Application 13/063,185[P]. 2009-9-9.

[84] Gysemans C A, Cardozo A K, Callewaert H, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 modulates expression of chemokines and cytokines in pancreatic islets: implications for prevention of diabetes in nonobese diabetic mice[J]. Endocrinology, 2005, 146(4): 1956-1964.

[85] Konnai S, Usui T, Ohashi K, et al. The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR[J]. Veterinary microbiology, 2003, 94(4): 283-294.

[86] Sato H, Hagiwara K, Nakamura S, et al. A comparison of sensitive and specific methods for the detection of Lily mottle virus in lily plants[J]. Journal of Phytopathology, 2002, 150(1): 20-24.

[87]赵进良，赵彦平，et al.细胞因子实时定量PCR 检测方法的建立和应用. 江苏

医药, 2007, 33(5): 486-488.

[88] Yin J L, Shackel N A, Zekry A, et al. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I[J]. Immunol Cell Biol, 2001, 79(3):213-221.

[89] Hein J, Schellenberg U, Bein G, et al. Quantification of murine IFN-γmRNA and protein expression: impact of real-time kinetic RT-PCR using SYBR Green I dye [J]. Scand J Immunol, 2001, 54:285-291.

[90] Moue M, Tohno M, Shimazu T, et al. Toll-like receptor 4 and cytokine expression involved in functional immune response in an originally established porcine intestinal epitheliocyte cell line[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -

General Subjects, 2008, 1780(2): 134-144.

[91]韩冬梅. 大肠杆菌不耐热肠毒素对小鼠胚胎稳定性的影响及分子机制的研究

[D]. 河北农业大学, 2012.

[92] Abrahams V. M, Kim Y. M, Straszewski S. L, et al. Macrophages and Apoptotic Cell Clearance During Pregnancy [J]. American Journal of Reproductive Immunology, 2004,51(4):275-28

[93] Chong C, Friberg M, Clements J D. LT(R192G), a non-toxin mutant of the heat-labile enterotoxin of Escherichia coli, elicits enhanced humoral and cellular immune responses associated with protection against lethal oral challenge with Salmonella spp[J]. Vaccine,1998,16(7):732-740.

[94] In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. Nature.2009 Aug 20; 460(7258):1021-5

[95] Resumption of HIV replication is associated with monocyte/macrophage derived cytokine and chemokine changes: results from a large international clinical trial. AIDS.2011 Jun 1;25(9):1207-17.

[96]刘志忠，丁秀荣， 袁宝军，等. 颅咽管瘤患儿血清IL-6, IL-8, MIP-1α含量变

化及其意义探讨[J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28(1): 78-80.

[97]陶少华. 运用Luminex 系统和传统检测方法分析妊高征母婴相关因子[D].

第一军医大学, 2007。

[98]黄广龙，漆松涛，李佳et al.核转录因子NF-kB在颅咽管瘤炎症中的表达[J]. 中国神经精神疾病杂志，2010;36(1)：39-42

[99] Allen C, Duffy S, Teknos T, et al. Nuclear factor-κB–related serum factors as longitudinal biomarkers of response and survival in advanced oropharyngeal carcinoma[J]. Clinical Cancer Research, 2007, 13(11): 3182-3190.

[100]朱建幸，谢利娟，朱晓东，等．较大潮气量机械通气致幼兔肺生物伤中NF-kB

的作用及对炎细胞因子的影响[J]．中华儿科杂志，2006, 44(4)：299—303．

[101] Nan B, Lin P, Lumsden AB, et a1．Effects of TNF—alpha and curcumin on the expression of thrombomodul in and endothel ial protein C receptor in human endothel ial cel ls．Thromb Res, 2005, 1 15: 417—26．

[102] Souza Neto, Araujo Fi lho I, Rego AC, et a1．Effects of simvastatin in abdominal sepsis in rats．Acta Cir Bras, 2006, 21 Suppl 4: 8—12．

[103] Samuel P, Barackman J, Ott G, et al. Intranasal immunization with influenza vaccine and a detoxified mutant of heat labile enterotoxin from Escherichia coli (LTK63)

[J]. Control Realease,2002.85(1-3):263-270.

[104] Kende M, Del Giudice G, Rivera N, Hewetson J, et al. Enhancement of intranasal vaccination in mice with deglycosylated chain A ricin by LTR72, a novel mucosal adjuvant[J]. Vaccine,2006,24(12):2213-2221.

[105] Marcel M, Timothy J, Seabrook, et al. Lemere. Modulation of humoral and cellular immune response in AimmunotheraphybytheadjuvantsmonophosphoryllipidA(MPL), choleratoxinB subunit(CTB) andE. colienterotoxinLT(R192G)[J]. Vaccine2005.

[106] HAVARD J, DOMINIQUE S, MARIAGRAZIA P, et al. Intranal Immunization with Pneumococcal Polysaccharide Conjugate Vaccines with Nontoxic Mutants of Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxins as Adjuvants Protects Miceagainst Invasive Pneumococcal Infections[J]. INFECTIONAND IMMUNITY,1999,67(11): 5892-5897.

[107] Maria A, Neil A, Williams, et al. Nasal Delivery of Antigen with the B Subunit of Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxin Augments Antigen-Specific T-Cell Clonal Expansion and Differentiation. [J] Infect Immun,2004,72(7):4072–4080. [101] Bentley S D, Chater K F, Cerdeno-Tarraga A M, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete Streptomyces coelicolor A3 (2)[J]. Nature, 2002, 417(6885): 141-147.

[108] Tran D Q, Baliga C S, Hart M C, et al. Dose effect of mncosal adjuvant LT(R192) on the Induction of Th1 and Th2 immunity[J]. Journal of Allergy and Clinicak Immunology,2004,113(2):290.

[109] Baudner C, Balland O, Giuliani M. M, et al. Enhancement of Protective Efficacy following Intranasal Immunization with Vaccine Plus a Nontoxic LTK63 Muttant Deli-vered with Nanoparticles[J]. Infect Immun,2002,70(9):4785–4790.

[110] Hiroki T, Keiko S, Miyuki T, et al. Mutant Escherichia coli enterotoxin as a mucosal adjuvant induces specific Th1 responses of CD4+and CD8+T cells to nasal killed-bacillus calmetteguerin in mice[J]. Vaccine,2006,24(17):3591-3598.

[111] Beignon A S, Briand J P, Rappuoli R, et al. The LTR72 Mutant of Heat-labile Enterotoxinof Escherichia coli Enhances the Ability of Peptide Antigens To Elicit CD4+T Cells and Secrete Gamma Interferon after Coapplication onto Bare Skin[J]. Infection and immunity,2002,70(6):3012-3019.

[112] Weber J M, Lennon R. Multi-course comparison of traditional versus web-based

Course delivery systems[J]. The Journal of Educators Online, 2007, 4(2): 1-19.

[113] Fadlelmawla A. Towards sustainable water policy in Kuwait: reforms of the current practices and the required investments, institutional and legislative measures[J]. Water resources management, 2009, 23(10): 1969-1987.

[114] Becker M C. A framework for applying organizational routines in empirical research: linking antecedents, characteristics and performance outcomes of recurrent interaction patterns[J]. Industrial and Corporate Change, 2005, 14(5): 817-846.

[115] Hughes TK, Cadet P, et al. Evidence for the production and action of interleukin-10 in pituitary cells[J]. Cell Mol Neurobiol, 1994,14(1): 59-69.

[116] Killeen N, Littman D R The regulation and function of the CD4 coreceptor during

T lymphocytedevelopment[J]．Curt Opin Immunol, 1996, 2: 89—96

[117] David K C, George F G CD8: Adhesion Molecule, Co·Receptor and Immuno-Modulator[J]. Cellular& Molecular Immunology,2004, 1(2)：81—88

[118] Pauly T, Thiel H J, Saalm A. Infection with classical swine fever virus: effects on phenotype and immune responsiveness of porcine T lymphocytes[J]. Journal of general virology, 1998, 79(1): 31-40

[119]徐曼. 重组疫苗E. coli LLO/OVA诱导小鼠树突状细胞活化及抗肿瘤T 细

胞免疫的研究[D]. 重庆医科大学, 2007。

[120] Beignon A S, Briand J P, Rappuoli R, et al. The LTR72 Mutant of Heat-labile Enterotoxinof Escherichia coli Enhances the Ability of Peptide Antigens To Elicit CD4+T Cells and Secrete Gamma Interferon after Coapplication onto Bare Skin[J]. Infection and immunity,2002,70(6):3012-3019.

[121] Nashar TO, Williams NA, Hirst TR, et al. Cross-linking of cell surface ganglioside GM1 induces the selective apoptosis of mature CD8+T lymphocytes[J]. Int Immunol, 1996, 8(5): 731-736.

[122] Shrasta, PhamCT, ThomasDA, etal． Howdo cytotoxic lymphoeytes kill their

TargetsCurr. Opin. Immunol, 1998, 10: 58l—587

[123]乔素兰，张曼夫，黄广明. IBDV强毒株与弱毒株对SPF鸡侵染过程的研究

[J]. 畜牧兽医学报, 2003, 34(1): 59-63.

[124]李成文，陈咏梅.霍乱毒素粘膜免疫佐剂的研究进展[J].国际生物制品学杂志，2004，(2)：60-62.

致谢

本论文是在上海市农业科学院畜牧所人畜共患病课题组恩师刘惠莉老师的悉心指导下完成的。三年来，老师不仅在学业上传道、授业、解惑，而且在生活中给予莫大的关心和帮助，使我们倍感温暖，受益良多。值此论文完成之际，谨此向刘老师致以我最崇高的敬意和衷心的感谢。

感谢上海市农业科学院畜牧所为我提供良好的实验环境和生活环境，感谢本课题组哈卓老师和饶柏忠老师在学习和实验过程中帮助与指导。感谢已经毕业的李诗焱师兄，以及王柏宁、李海洋，同学王元、韩晓、徐利、罗爱琼在生活上的关心和实验上的帮助，是他们让我的硕士生活变得丰富多彩。

感谢上海市农业科学院生物所的潘爱虎老师、李鹏老师，已经毕业的韩芳婷师姐、马瑞芳师姐，以及柯亚光师兄、孔德艳师姐在实验技术上的指导，得到他们的协助，我的论文才得以顺利完成。感谢上海市动物疫病预防控制中心的鞠厚斌老师在实验过程中给与的指导和帮助。

最后我要衷心感谢我的家人，他们为我提供了良好的教育环境，让我可以在学习这条路上走得更远更好。衷心感谢所有帮助过我的老师、同学和朋友们。

董端凝

2013年于上海海洋大学