

· 论 著 ·

[文章编号]1000-8861(2010)06-0502-05

## IL-18、IL-12 及相关因子在大鼠实验性自身免疫心肌炎心肌中的表达时程和特征

常贺, 李刚<sup>△</sup>, 张乐, 邹军\*, 朱铨, 金鑫

**[摘要]** 目的 探讨 IL-18、IL-12 及相关细胞因子在大鼠实验性自身免疫心肌炎(EAM)心肌中的表达时程和特征。方法以猪心脏肌球蛋白加等体积弗氏完全佐剂, 辅结核杆菌 H37Ra 株之乳液为抗原, 于 Lewis 大鼠双后肢皮下注射造模(EAM); 用胶原酶灌流和网筛过滤法分离纯化心肌细胞; 经免疫组化技术评估心肌损伤程度; 按实时荧光定量法测急性期和慢性期 IL-18、IL-12 及相关因子(IL-18R, IL-18RAcPL, IL-18BP 以及 IL-12p40, IL-12p35, IL-12R $\beta_1$ , IL-12R $\beta_2$ )mRNA 表达情况。结果 IL-18、IL-12 及相关因子表达主要在急性期, 免疫后 2 周表达增多并达峰值( $P < 0.01$ , 与正常对照组比较) 4 周后减少, 并与 EAM 病程正相关; IL-18、IL-12 及相关因子主要在巨噬细胞表达, 其受体复合物在  $\alpha\beta$  T 细胞表达, 慢性期仅 IL-18BP 在心肌细胞有表达。结论 IL-18、IL-12 及相关因子参与 EAM 病理过程, 各因子主要集中于急性期巨噬细胞和  $\alpha\beta$  T 细胞表达。

**[关键词]** IL-18, IL-12, 实验性自身免疫性心肌炎, 实时荧光定量 RT-PCR

**[中图分类号]** R542.2+1 **[文献标识码]** A

### Time course and properties of myocardial expression of IL-18, IL-12, and related cytokines in rat experimental autoimmune myocarditis

CHANG He, LI Gang, ZHANG Le, ZOU Jun, ZHU Xuan, JIN Xin

Department of Cardiology, Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361005, China

**[Abstract]** To explore the time course and properties of myocardial expressions of IL-18, IL-12, and related cytokines in rat experimental autoimmune myocarditis (EAM), an antigen was prepared with an emulsion of porcine cardiac myosin in isopyknic complete Freund's adjuvant, plus *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra strain. EAM model was made by hypodermic injection of the antigen in hind legs of Lewis rats. Then the isolation and purification of cardiocytes were carried out through the methods of collagenase perfusion and mesh screen filtration, respectively. The degree of myocardial damage was evaluated by immunohistochemistry technique. In accordance with real-time fluorescence quantitative RT-PCR, the mRNA expression of IL-18, IL-12 and related cytokines (IL-18R, IL-18RAcPL, IL-18BP and IL-12p40, IL-12p35, IL-12R $\beta_1$ , IL-12R $\beta_2$ ) were examined in the acute- and the chronic-phase. The results showed that the expression of IL-18, IL-12 and related cytokines mainly occurred in the acute phase, the peak value of expression was at 2 week after immunization ( $P < 0.01$ , compared with control), and diminished at 4 week after immunization, which presented a positive correlation with EAM course. IL-18, IL-12 and related cytokines mainly expressed in macrophage, their receptor complex expressed in  $\alpha\beta$  T cells, and IL-18BP however, expressed only in cardiac myocytes in the chronic phase. In conclusion, IL-18, IL-12, and related cytokines are involved in the pathological process of EAM. The expression of various related cytokines almost concentrate on macrophage and  $\alpha\beta$  T cells in the acute phase.

**[Key words]** IL-18, IL-12, Experimental autoimmune myocarditis, Real-time fluorescence quantitative RT-PCR

心肌炎是扩张型心肌病的主要发病原因, 能造成心衰和猝死年轻化, 目前治疗还仅限于对症, 尚不能从疾病进程和病理生理层面对因处理<sup>[1]</sup>。心肌炎发病与自身免疫机制有关。在实验性自身免疫性心肌

炎(Experimental autoimmune myocarditis, EAM)发病机制中, 细胞因子对于各种炎性细胞活性调节起关键作用<sup>[2]</sup>。IL-18 和 IL-12 均属 I 型辅助性 T 淋巴细胞(Th1)型细胞因子, 是重要免疫调节剂, 具有许多类似生物学活性, 尤其在诱导 IFN- $\gamma$  和 Th1 型免疫应答反应上, 两者相互协同, 能将巨噬细胞和自然杀伤细胞(NK)介导的非特异性免疫, 与 Th 细胞、细胞毒 T 细胞(Tc)介导的特异性免疫有机结合, 在机体免疫中发挥重要作用, 对治疗感染性疾病和增强疫苗免疫功效等方面有广阔应用前景<sup>[3]</sup>。目前, 有关

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30670512), 教育部留学归国启动经费(教外司留[2008]890号)

作者单位: 361005 厦门大学附属中山医院内科(常贺), 361005 厦门大学医学院药理学系(李刚, 张乐, 邹军, 朱铨, 金鑫)

\* 通信作者: 邹军, Tel: 13860425867, E-mail: zoujun@xmu.edu.cn

<sup>△</sup> 共同第一作者

IL-18、IL-12 及相关细胞因子在 EAM 发病时程及表达特点等报道不多,机理还有待进一步阐明,为此,我们进行本研究。

## 1 材料与方 法

**1.1 主要试剂** 逆转录试剂盒 SuperScriptII(美国 Invitrogen);弗氏完全佐剂(美国 Sigma);H37Ra 株热灭活结核杆菌(美国 Difco);MagExtractor 基因组提取试剂盒(日本东洋纺);SYBR Premix Ex Taq(大连宝生物工程);引物 TaKaRa 设计合成。

**1.2 主要仪器** LightCycler 荧光实时定量 PCR 仪(德国罗氏公司)。

**1.3 实验动物** 8 周龄 Lewis 雄性大鼠 70 只,体质量 180~220 g,中科院上海实验动物中心提供。

**1.4 抗原制备** 提取猪心脏肌球蛋白溶解于 0.3 mol/L KCl 溶液中配制成浓度为 10 mg/ml,加同等体积弗氏完全佐剂及结核杆菌 H37Ra 株之乳液,充分混合制成抗原。

**1.5 动物分组与 EAM 模型制作** ①动物分组 将大鼠随机分为 EAM 模型组和 NS(生理盐水)对照组。EAM 组再随机分为 14、18、21、28 和 90 d 5 个亚组,每组 10 只大鼠,对照组仅注射 NS。②模型制作 将大鼠固定于鼠架中,EAM 和 NS 组分别在大鼠的双后肢皮下注射抗原或 NS 0.2 ml,免疫当日记为 0 d,各组动物观察至相应时间点后处死,开胸取心脏。

**1.6 组织病理学检查** 取心尖部约 5 mm 厚度心肌,经 10%福尔马林溶液固定,石蜡包埋、切片,按 HE 及 Azan-Mallory 法染色。

**1.7 细胞提取及精制** 免疫 18 和 90 d 大鼠,按文献[4]方法,用纤维酶原溶液灌流 15~20 min 提取细胞。将提取细胞溶于等渗平衡液中,用 38 和 20  $\mu$ m 直径网筛滤过(大于 38  $\mu$ m 为心肌细胞,小于 20  $\mu$ m

为非心肌细胞)。正常心脏组织中,非心肌细胞含量较少,免疫后 18 d 可见大量非心肌细胞。进一步分离提取心肌细胞和非心肌细胞,可分离出  $\alpha\beta$  T 细胞、CD11b<sup>+</sup> 细胞和非心肌细胞 (NC) 非炎症细胞 (NCNI)。

**1.8 RNA 提取和 cDNA 合成** 按常规用 TRIzol 试剂盒提取各组心肌组织,以及  $\alpha\beta$  T、CD11b<sup>+</sup>、NC 和 NCNI 细胞 RNA;用随机引物和逆转录酶 SuperScript II 合成 cDNA。RNA 总量为 5  $\mu$ g,cDNA 终体积为 20  $\mu$ l,于 -20  $^{\circ}$ C 保存。

**1.9 重组质粒构建** 以 cDNA 为模板分别行 PCR 扩增,用回收 PCR 产物与 pGEM-T 载体连接,转入大肠杆菌 JM109,用 MagExtractor 基因组提取试剂盒提取和纯化质粒。

**1.10 实时定量 RT-PCR** 以 100 倍稀释质粒和 cDNA 各 2  $\mu$ l 为模板,用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒和 LightCycler 实时定量 PCR 仪做 PCR 扩增。所有样品拷贝数,用 LightCycler 统计软件计算。引物见表 1。

**1.11 统计学处理** 实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 StatView5.0 软件进行 *t* 检验, $P < 0.05$  为有显著差异。

## 2 结果

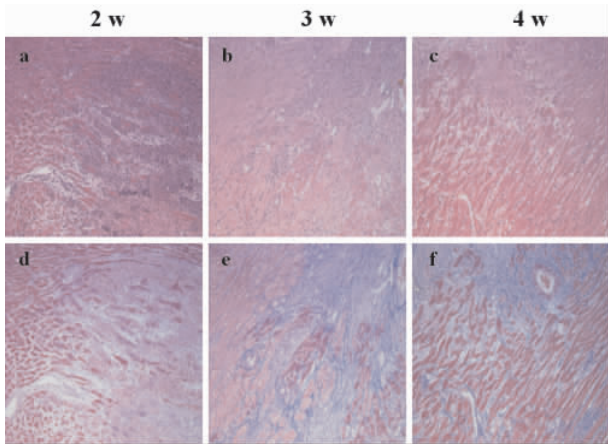
**2.1 大鼠 EAM 组织病理学时程** 免疫后 2 周,于 EAM 组大鼠心肌组织,可见广泛多量炎性细胞浸润和组织坏死,随病程进展炎症、坏死逐渐减轻。免疫后 4 周,可见局部心肌出现纤维化,而正常对照组心肌组织未见异常(图 1)提示 EAM 造模成功。

**2.2 IL-18 及相关因子在大鼠 EAM 急性期表达时程** IL-18 及相关因子表达随 EAM 病程而变化。免疫后 2 周,IL-18、IL-18R、IL-18RAcPL 和 IL-18BP mRNA 表达明显升高并达峰值,随病程延长逐渐减少(4 周),见图 2。

表 1 大鼠实验性自身免疫性心肌炎(EAM)急性期实时定量 RT-PCR 引物一览表

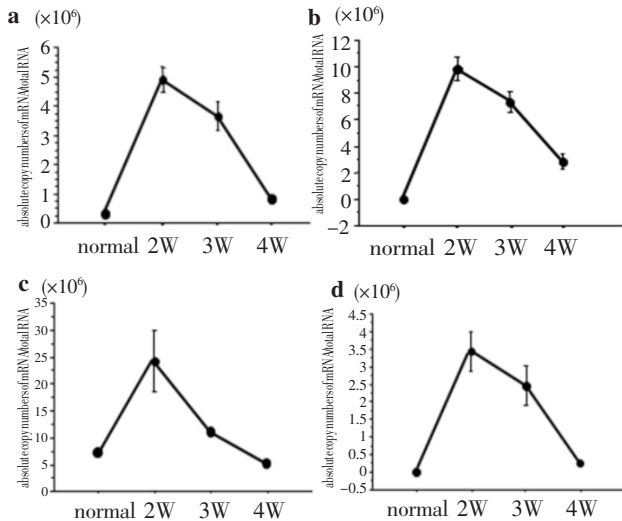
Tab 1 Primers for quantitative real time RT-PCR in acute phase of EAM in rats

Sort of IL	Sense primer	Antisense primer
IL-18	5'-agaagaaggctctgtgcaactt-3'	5'-tacaggagaggtagacatccttc-3'
IL-18R	5'-ccaacgaagaagccacagaca-3'	5'-ctcaggatgacactctctcag-3'
IL-18RAcPL	5'-cctatctgatgtccagtggt-3'	5'-ggacaatgaatggagccagt-3'
IL-18BP	5'-gagaattcatttaaatgagacactgtggctgtgcagca-3'	5'-gcagcatcgcggccgtggggcccctgggctctgatct-3'
IL-12p40	5'-ccactcacatctgctgctccacaag-3'	5'-acttctctagtccttttggttcag-3'
IL-12p35	5'-ccacaaaagactctttgatgatg-3'	5'-ctcagatagttcatcaccctgttg-3'
IL-12R $\beta$ 1	5'-ggacttgagctgctacagggtttc-3'	5'-tccagttgtacaggtactgcgata-3'
IL-12R $\beta$ 2	5'-atattggaaggagcgaactctac-3'	5'-tggatctggaatagttctgcaata-3'



EAM rats immunized at day 0 (normal) and killed at day 14 (week 2), 21 (week 3), and 28 (week 4) after injection of cardiac myosin and stained with H&E (a, b, c) and Azan-Mallory staining (d, e, f). Photos showed that multiple and extensive inflammatory cells formed and infiltrated into myocardium at week 2 after immunity (a, d), inflammation and necrosis gradually alleviated at week 3 (b, e), and partial fibrosis appeared at week 4 (c, f), respectively (n = 3).

图1 大鼠实验性自身免疫性心肌炎(EAM)组织病理学病程( $\times 20$ )  
Fig 1 Time course of histopathological demonstration in EAM rats( $\times 20$ )



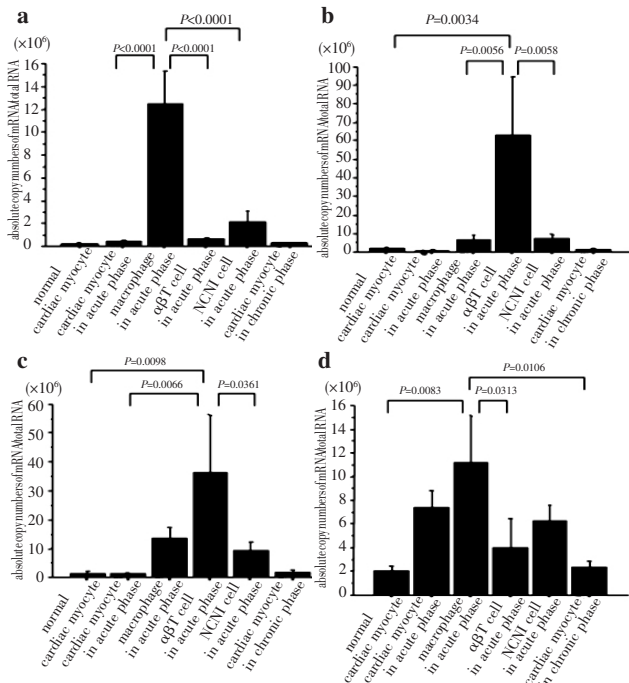
EAM rats immunized at day 0 (normal) and killed at week 2, 3 and 4 (x-axis) in the acute phase. y-axis: absolute copy numbers of mRNA/total RNA (n = 3). a) IL-18 b) IL-18R c) IL-18RAcPL d) IL-18BP. Illustration indicated that the expression climax of various cytokines was at week 2 after immunity, and gradually decreased from week 3 to week 4.

图2 IL-18及相关因子在大鼠实验性自身免疫性心肌炎(EAM)急性期心肌表达时程

Fig 2 Time courses of the myocardial expression of IL-18 and related cytokines in EAM rats

**2.3 IL-18及相关因子在大鼠EAM急性期和慢性期表达特征** 从正常心肌及EAM急性期(18 d)和慢性期(90 d)分离纯化细胞显示,在急性期,IL-18主要表达于巨噬细胞中(图3a),IL-18R表达于 $\alpha\beta$  T细胞(图3b),IL-18RAcPL可在 $\alpha\beta$  T细胞,巨噬细胞和NCNI细胞表达(图3c),而IL-18BP可表达于多种细胞,但急性期主要在巨噬细胞和NCNI细胞表达(图3d)。慢性期除IL-18BP在心肌细胞有些表达外,其他细胞均表达很少。

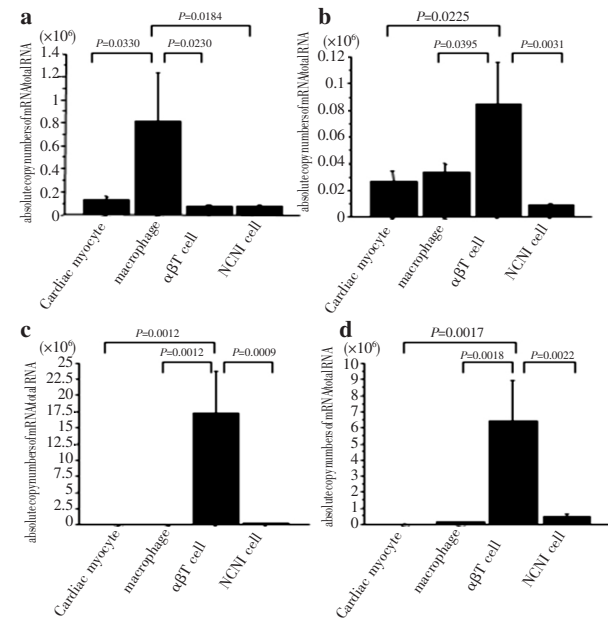
**2.4 IL-12及相关因子在大鼠EAM急性期心肌表达特征** IL-12p40主要在巨噬细胞表达(图4a),IL-12p35主要在 $\alpha\beta$  T细胞表达;也能在巨噬细胞、心肌细胞检出,但在NCNI细胞较少(图4b)。IL-12R $\beta_1$ 和IL-12R $\beta_2$ 在 $\alpha\beta$  T细胞有较多表达(图4b~d),而在心肌细胞和巨噬细胞却没有或很少有表达(图4c,d)。



a) IL-18 b) IL-18R c) IL-18RAcPL d) IL-18BP. y-axis: absolute copy numbers of mRNA/total RNA (n=3); x-axis: cells separated and purified from normal and EAM heart in the acute- (day 18) and the chronic- phase (day 90), including normal cardiac myocytes, macrophages,  $\alpha\beta$  T cells, and non-cardiomyocytic non-inflammatory (NCNI) cells in the acute phase, and cardiac myocytes in the chronic phase.

图3 IL-18及相关因子在大鼠EAM急性期和慢性期心肌表达特征

Fig 3 Properties of the myocardial expression of IL-18 and related cytokines in rat EAM during the acute- and the chronic-phase



a)IL-12p40 ,b)IL-12p35 ,c)IL-12R $\beta_1$  ,d)IL-12R $\beta_2$  . y-axis: absolute copy numbers of mRNA/total RNA (n=3). x-axis: cells separated and purified from an EAM heart in the acute phase (day 18), including normal cardiac myocytes, macrophages,  $\alpha\beta$  T cells, and NCNI cells.

图 4 IL-12 及相关因子在大鼠 EAM 急性期心肌表达特征  
Fig 4 Properties of the myocardial expression of IL-12 and related cytokines in rat EAM during the acute phase

### 3 讨论

本研究显示,IL-18、IL-12 及相关因子在大鼠 EAM 心肌表达主要发生在急性期,免疫后 2 周表达增多并达峰值,4 周后减少,并与 EAM 病程呈正相关。IL-18 和 IL-12p40 主要表达于巨噬细胞;IL-18R、IL-12p35、IL-12R $\beta_1$  和 IL-12R $\beta_2$  在  $\alpha\beta$  T 细胞有较多表达,IL-18R $\alpha$  和 IL-18BP 可在  $\alpha\beta$  T 细胞,巨噬细胞和 NCNI 细胞表达,但急性期却主要在巨噬细胞和 NCNI 细胞表达。IL-12p35 也能在巨噬细胞、心肌细胞检出,但在 NCNI 细胞表达较少。慢性期仅 IL-18BP 在心肌细胞有表达,其他因子表达均少。本研究首次全面系统证明,IL-18、IL-12 及相关因子参与 EAM 急性期病理进程,免疫细胞主要集中于巨噬细胞和  $\alpha\beta$  T 细胞。IL-18 和 IL-12 在相似时段和相似细胞表达特性表明,在 Th1 免疫反应中两者确有相互关联和协同作用,这与文献资料基本一致。已知  $\alpha\beta$  T 细胞占 T 细胞总数 95% 以上,识别由 MHC 分子提呈的蛋白质抗原,具有 MHC 限制性,是介导细胞免疫及免疫调节的主要细胞。大鼠 EAM 类似人巨细胞心肌炎,反复发作会导致扩张性心肌病。巨噬细胞和 CD4 $^+$  $\alpha\beta$  T 在 EAM 急性期均能渗入心脏,其中 CD4 $^+$  $\alpha\beta$  T 在该病启动进程中起重要作用<sup>[5]</sup>。免疫分子在 EAM 心脏基因表达变化,从急性期到恢复期,是多种多样的,例如,Th1 细胞因子在急性期增加,恢复期却减少,而 Th2 细胞因子在恢复期增加。本人曾证明,IL-17 在 EAM 急性期就有  $\alpha\beta$  T 细胞高度表达,在 EAM 发病中起重要作用,抑制 IL-17 也许是改善 EAM 的可能途径<sup>[6]</sup>。

IL-18 属 IL-1 超家族成员<sup>[7]</sup>,主要产生于活化的巨噬细胞和肝脏枯否细胞,为 Th1 反应辅助因子,具有多种生物学功能,如诱导 IFN- $\gamma$ <sup>[8]</sup> 增强 NK 细胞细胞毒作用,促进 T 细胞增殖等。IL-12 是抗原提呈细胞分泌表达的一种细胞因子,对靶细胞生物学效应也是多种多样,其独特、重要生物学活性是调节 Th1 和 Th2 细胞间平衡,通过促进 Th1 反应,增强细胞免疫应答,诱导分泌 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  等因子表达,促进细胞毒性 T 淋巴细胞毒性和增强 NK 杀伤

效应,对免疫调节、抗肿瘤及抗感染等有十分重要作用。IL-18 和 IL-12 具有许多类似生物学活性,但结构上却不相似。据报道,在诱导 IFN- $\gamma$  和 Th1 反应上,两者相互协同,是相应信号转导途径相互作用,活化 IFN- $\gamma$  基因表达等所致,也是相应受体表达增强结果。IL-18 通过活化 IL-1 受体(IL-1R)相关激酶(IRAK)/TNFR 相关因子(TRAF)途径,活化蛋白(AP)21 和 NF- $\kappa$ B,从而诱生 IFN- $\gamma$ <sup>[9]</sup>。IL-12 则是通过活化 Janus 激酶(JAK)信号转导物及转录信号途径活化因子(STAT)系统诱生 IFN- $\gamma$ 。IL-12 和 IL-18 也可相应增加其在 T 细胞上受体,刚分离出 T 细胞不能表达 IL-18R $\alpha$ ,也不能对 IL-18 刺激产生应答,但用 IL-12 刺激后,就能逐渐表达 IL-18R $\alpha$ ,对 IL-18 产生应答。IL-18 还可增强 Th1 细胞表达 IL-12R $\beta_2$ <sup>[10]</sup>。因此,IL-18 和 IL-12 可在各种水平协同诱导 IFN- $\gamma$ 。在 IL-12 协同作用下,IL-18 还能诱导 NK 细胞、B 细胞、巨噬细胞和 CD8 $^+$  T 细胞生成 IFN- $\gamma$ 。因此,IL-12 为 IL-18 诱导 IFN- $\gamma$  之所需<sup>[11]</sup>。

IL-18R 属于 IL-1 受体/Toll 样受体(IL-1R/TLR)家族,是 IL-18R $\alpha$  和 IL-18R $\beta$  复合体。IL-18R $\alpha$  直接结合 IL-18。IL-18R $\beta$ ,即 IL-18R $\beta$  样受体,因 IL-18R $\beta$  与 IL-1R 辅助蛋白 IL-18BP 同源而得名。IL-18R $\beta$  本身不直接结合 IL-18,但与 IL-18R $\alpha$  形成复合物后可增加 IL-18R $\alpha$  与 IL-18 亲和力,有信号转导作用。IL-18R $\alpha$  和 IL-18R $\beta$  共同表达对由 IL-18 引起 NF- $\kappa$ B 和 Janus 激酶(JNK)活化所必需<sup>[12]</sup>。IL-18BP,即 IL-18 结合蛋白,是 IL-18 天然拮抗剂,它可高亲和力与 IL-18 结合,阻断 IL-18 诱导 IFN- $\gamma$  产生及 NF- $\kappa$ B 活化。IL-18 及 IL-18/IL-18BP 复合体局部水平,可能在决定 IL-18 生物学活性方面有重要作用,有人证明,提高 IL-18BP 在关节腔内表达或给予外源性 IL-18BP,均可以使胶原诱导关节炎发生率减低及关节周围 TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平下降。因此,利用 IL-18BP 拮抗 IL-18 生物学活性,可在炎症、感染性疾病和肿瘤中发挥重要免疫调控及免疫预防作用<sup>[13-14]</sup>。

总之,IL-18、IL-12 及相关因子参与 EAM 急性期病理进程,其靶细胞主要是巨噬细胞和  $\alpha\beta$  T 细胞。IL-18 和 IL-12 在 Th1 免疫反应中有相互关联和协同作用,这也许为深入探讨自身免疫性心肌炎或自身免疫性疾病发病机制,以及未来预警并防治此类疾病将提供新的基础实验依据。

## 【参考文献】

- [1] Cihakova D, Barin JG, Baldeviano GC, et al. L.E.A.P.S. heteroconjugate is able to prevent and treat experimental autoimmune myocarditis by altering trafficking of autoaggressive cells to the heart[J]. *Int Immunopharmacol* 2008, 8(5): 624-633.
- [2] Li Y, Heuser JS, Kossanke SD, et al. Protection against Experimental Autoimmune Myocarditis Is Mediated by Interleukin-10-Producing T Cells that Are Controlled by Dendritic Cells[J]. *Amer J Pathol* 2005, 167(1): 5-15.
- [3] 吴欣. IL-12和IL-18与Th1型辅助T细胞应答[J]. *国外医学: 免疫学分册* 2002, 25(5): 244-246.
- [4] Blankenberg S, Tiret L, Bickel C. Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular death in stable and unstable angina[J]. *Circulation* 2002, 106(1): 24-30.
- [5] Yoshida T, Hanawa H, Toba K, et al. Expression of immunological molecules by cardiomyocytes and inflammatory and interstitial cells in rat autoimmune myocarditis[J]. *Cardiovasc Res* 2005, 68: 278-288.
- [6] Chang H, Hanawa H, Yoshida T, et al. Alteration of IL-17 Related Protein Expressions in Experimental Autoimmune Myocarditis and Inhibition of IL-17 by IL-10-Ig Fusion Gene Transfer[J]. *Circ J* 2008, 72: 813-819.
- [7] Iannello A, Samarani S, Debbeche O, et al. Potential Role of Interleukin-18 in the Immunopathogenesis of AIDS Involvement in Fratricidal Killing of NK Cells [J]. *J virology*, 2009, 83(12): 5999-6010.
- [8] 熊盛道, 徐国鹏, 熊维宁. rIL-18对肺炎链球菌肺炎小鼠Th1/Th2免疫应答的影响[J]. *免疫学杂志* 2008, 24(1): 69-72.
- [9] Tsutsui H, Matsui K, Okamura H. Pathophysiological roles of interleukin-18 in inflammatory liver diseases [J]. *Immunol Rev* 2000, 174(3): 192-209.
- [10] Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production [J]. *J Immunol*, 1998, 161(7): 3400-3407.
- [11] Kohn K, Kataoka J, Ohtsuki T. IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12[J]. *J Immunol*, 1997, 158(4): 1541-1550.
- [12] 杜鹏飞. IL-18与代谢综合征的关系研究进展[J]. *国外医学: 内分泌学分册* 2004, 24(suppl): 21-23.
- [13] 史卫红. IL-18、IL-18BP在肝脏疾病及肿瘤中的作用研究进展[J]. *国际免疫学杂志*, 2008, 31(2): 134-138.
- [14] 崔激, 郝淑维, 李保红. IL-18基因转染对小鼠卵巢癌OVHM细胞免疫生物学特性的影响[J]. *免疫学杂志*, 2008, 24(4): 456-458, 463.

(收稿日期: 2009-11-11; 修回日期: 2010-03-13)

(编辑 侯瑞)

(上接第501页)

- 南[J]. *国外医药抗生素分册*. 2008, 29(2): 88-90.
- [2] Jarva H, Ngampasutadol J, Ram S, et al. Molecular Characterization of the Interaction between Porins of *Neisseria gonorrhoeae* and C4b-Binding Protein [J]. *J Immunol*, 2007, 179(1): 540-547.
- [3] Hansen JK, Demick KP, Mansfield JM, et al. Conserved Regions from *Neisseria gonorrhoeae* Pilin Are Immunosilent and Not Immunosuppressive [J]. *Infect Imm*, 2007, 75(8): 4138-4147.
- [4] Kline KA, Criss AK, Wallace A, et al. Transposon Mutagenesis Identifies Sites Upstream of the *Neisseria gonorrhoeae* pilE Gene That Modulate Pilin Antigenic Variation [J]. *J Bacteriol*, 2007, 189(9): 3462-3470.
- [5] Tong Y H, Reinhold V, Reinhold B, et al. Structural and immunochemical characterization of the Lipooligosaccharides expressed by *neisseria subflava* 44 [J]. *J Bacteriol*, 2001, 183(3): 942-950.
- [6] Gulati S, McQuillen DP, Mandrell RE, et al. Immunogenicity of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide epitope, 2C7, widely expressed *in vivo* with no immunochemical similarity to human glycosphingolipids [J]. *J Infect Dis*, 1996, 174(6): 1223-1237.
- [7] Yamasaki R, Koshino H, Kurono S, et al. Structural and immunochemical characterization of a *Neisseria gonorrhoeae* epitope defined by a monoclonal antibody 2C7; the antibody recognizes a conserved epitope on specific lipooligosaccharides in spite of the presence of human carbohydrate epitopes[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(51): 36550-36558.
- [8] Ngampasutadol J, Rice P A, Walsh MT, et al. Characterization of a peptide vaccine candidate mimicking an Oligosaccharide epitope of *Neisseria gonorrhoeae* and resultant immune responses and function [J]. *Vaccine*, 2006, 24(2): 157-170.
- [9] Gnehm H, Pelton S, Gulati S, et al. Characterization of antigens from nontypable *Haemophilus influenzae* recognized by human bactericidal antibodies. Role of *Haemophilus* outer membrane proteins[J]. *J Clin Invest*, 1985, 75(5): 1645-1658.
- [10] Ngampasutadol J, Ram S, Gulati S, et al. Human factor H interacts selectively with *Neisseria gonorrhoeae* and results in species-specific complement evasion [J]. *J Immunol*, 2008, 180(5): 3426-3435.
- [11] 陈丹, 王宏, 朱中松等. VEGF189基因合成、原核表达及鉴定[J]. *免疫学杂志*, 2009, 25(4): 469-472.
- [12] Yin Y, Zhang J, Dong DY, et al. Chimeric hepatitis B virus core particles carrying an epitope of anthrax protective antigen induce protective immunity against *Bacillus anthracis*[J]. *Vaccine*, 2008, 26(46): 5814-5821.

(收稿日期: 2009-12-01; 修回日期: 2010-03-14)

(编辑 李海鸥)