

# 小鼠免疫刺激后乳腺 *pIgR* mRNA 转录及乳特异性 IgA 含量的变化

赵圣国, 王加启, 张春刚, 卜登攀, 刘光磊, 张春林, 章玉涛, 周凌云

(中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所, 动物营养学国家重点实验室, 北京 100193)

**摘要:** 为了探讨免疫刺激后昆明小白鼠乳腺 *pIgR* 基因 mRNA 转录和特异性 IgA 含量变化。选择 48 只健康受孕昆明小白鼠, 分为 A、B、C、D 组, 分别于分娩后第 4 天注射灭菌生理盐水、Lipase+ 灭菌生理盐水、空 ISCOM 和 Lipase + LTB + ISCOM, 每组注射 12 只, 并于分娩后第 8 天和 12 天采集小鼠乳样、血样和乳腺组织, 用间接 ELISA 法测定乳和血浆中的特异性 IgA 含量, 用 RealTime-PCR 检测小鼠乳腺中 *pIgR* 基因的相对转录水平。结果表明, 免疫刺激对小鼠血浆中特异性 IgA 的含量无显著性影响 ( $P > 0.05$ ), 但是免疫 B 组和 D 组中小鼠分娩后 12 d 的乳中特异性 IgA 含量显著高于 8 d 乳中的特异性 IgA 含量 ( $P < 0.05$ )。RealTime-PCR 相对定量也表明, 免疫 B 组和 D 组中小鼠分娩后 12 d 的乳腺 *pIgR* 基因转录水平显著高于 8 d 乳腺 *pIgR* 基因转录水平 ( $P < 0.05$ )。免疫刺激后小鼠乳腺 *pIgR* 基因转录水平的提高能增加乳中特异性 IgA 的含量。

**关键词:** *pIgR*; mRNA; IgA; 乳腺

中图分类号: S865.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)06-0019-06

## Variation of *pIgR* Expression and Specific IgA Concentration in Mammary Gland of Mice after Immune Stimulus

ZHAO Sheng-guo, WANG Jia-qi, ZHANG Chun-gang, BU Deng-pan, LIU Guang-lei,

ZHANG Chun-lin, ZHANG Yu-tao, ZHOU Ling-yun

(State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal

Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract** To study the effect of immune stimulus on *pIgR* mRNA expression and specific IgA concentration in mammary gland. Forty eight Kunming white mice were divided into four groups, 12 mice per group. They were injected different vaccines as following at days 4 after parturition: A group (CK) isotonic Na chloride, B group Lipase + isotonic Na chloride, C group ISCOM, D group Lipase + LTB + ISCOM. The samples including blood, milk and mammary gland tissues were collected at days 8 and days 12 after parturition. The specific IgA concentration in mouse plasma and milk was determined by indirect ELISA. The specific IgA concentration in mouse plasma was not significant among four groups ( $P < 0.05$ ), whereas that in mouse milk of B and D group at days 12 was higher than that at days 8. And the results of RealTime-PCR also demonstrated that the *pIgR* gene expression in mammary gland at days 12 of group B and D was higher than that at days 8. Immune stimulus can enhance the expression of *pIgR* mRNA expression and specific IgA concentration, and the *pIgR* gene over-expression could increase the specific IgA level in milk.

**Key words** *pIgR*; mRNA; IgA; Mammary gland

21 世纪刚开始, SARS 禽流感、H1N1 等提醒人类, 提高机体免疫能力才能有健康的生命。牛奶是免疫球蛋白的重要来源, 人们从初乳或免疫乳中可以获得大量免疫球蛋白, 提升免疫力。免疫球蛋白

同时也是新生动物出生后免疫物质的主要来源, 牛奶中的免疫球蛋白主要有 IgG1、IgG2、IgA 和 IgM。其中 IgA 分为血清型及分泌型两种, 血清型 IgA 存在于血清中, 其含量占总 IgA 的 85% 左右; 分泌型

收稿日期: 2010-08-19

基金项目: 北京市自然科学基金 (6092017); 国家自然科学基金 (30871837); 国际合作项目 (2009DFB30530)

作者简介: 赵圣国 (1984-), 男, 山东临沂人, 博士, 主要从事反刍动物营养与牛奶品质改良研究工作。

通讯作者: 王加启 (1967-), 男, 安徽宿州人, 研究员, 博士生导师, 主要从事反刍动物营养和牛奶品质改良研究。

IgA 存在于分泌液中,如唾液、乳、胃肠液等。分泌型 IgA 是机体粘膜局部抗感染免疫的主要抗体。牛初乳中 IgA 含量为 3 mg/mL,常乳为 0.1 mg/mL<sup>[1]</sup>。这些分泌型 IgA 由多聚免疫球蛋白受体 (pIgR) 参与介导跨过上皮细胞膜转运进入外分泌物<sup>[2]</sup>。目前,乳腺中免疫球蛋白的合成、修饰、转运和分泌的分子机理成为探索的出发点。pIgR 是一个完整的跨膜分泌片段,位于这些上皮细胞的基底面和侧面,可以与多聚 IgA 或 IgM 分子上的“J”链接合,介导多聚免疫球蛋白,尤其是多聚 IgA 的跨上皮细胞转运与分泌。pIgR 分子在运输完二聚体 IgA 分子跨过上皮细胞膜后是不可回收的,该受体在上皮细胞顶端被蛋白酶水解,释放出的分泌片段 (SC) 进入分泌物中,SC 可结合到二聚体 IgA 上。因此, pIgR 具有两个功能,跨粘膜细胞层上皮细胞转运二聚体 IgA 和保护二聚体 IgA 免受降解。Groot 等<sup>[3]</sup> 研究了小鼠乳腺中 pIgR 基因的过量表达能改变乳成分,并且指出一个 pIgR 分子只能运输一个二聚体 IgA 分子 (1:1 比例),所以乳腺中 pIgR 分子的数量是牛奶中 IgA 含量的限制性因素。国内外尚未有关于免疫刺激对 pIgR 转录水平影响的报告。本试验以小鼠为模型,研究免疫刺激后乳腺中 pIgR 基因的 mRNA 转录变化及其与乳中特异性 IgA 变化的相关性,从而为解释乳中 IgA 分泌转运的机理提供一定的理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂、仪器

卵磷脂、胆固醇和脂肪酶 (Lipase) 均购自 Sigma 公司,皂甙 (QuilA)、大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位 (LTB) 和 n-癸酰基-N-甲基糖苷 (MEGA-10) 购自德国 Boehringer-Ingelheim 公司。2×Taq PCR Master 购自北京康润诚业生物科技有限公司。荧光定量 PCR 用的 2×SYBR GreenI 试剂盒购自欧比特公司。总 RNA 提取试剂盒 (RNA simple Total RNA Kit) 和 cDNA 第一链合成试剂盒 (Quantscript RT Kit) 均购自天根生化科技 (北京) 有限公司。

手持匀浆器 (Mini bead-beater Biospec); PE 7500 型荧光定量 PCR 仪 (PE 7500 PE 公司); PCR 仪 (Mycycler™ Thermal Cycler Bio-RAD); 紫外可见分光光度计 (DU800 型, Beckman 公司)。

### 1.2 小鼠及饲养管理

试验动物为昆明小白鼠, 来自中国医学科学院试验动物研究所 (清洁级, 许可证编号: SCXK (京) 2004-0001)。选择体重为 25 g 健康雄鼠 20 只, 单笼饲养; 同时选择健康雌鼠 60 只, 体重为 20~22 g 每笼 3

只, 适应 7 d 后, 将雄鼠放入雌鼠笼中交配, 使其怀孕, 次日检查阴道栓, 有阴道栓的可以计为妊娠 1 d。

### 1.3 试验设计

选取受孕昆明小白鼠 48 只, 随机分为 4 组, 见表 1。疫苗抗原采用纯化的脂肪酶 Lipase (Type VIII from *Pseudomonas* sp., Sigma), 疫苗终浓度为 1 mg/mL, 免疫剂量为 50 μg/(只·次), LTB 剂量为 10 μg/(只·次)。疫苗注射时间为分娩后第 4 天, 腹腔注射。

表 1 小鼠分组情况

Tab 1 The groups of the experiment		
分组 Groups		免疫疫苗 Vaccine
A	对照组 CK	灭菌生理盐水
B	试验 1 组 LOC1	Lipase + 灭菌生理盐水
C	试验 2 组 LOC2	空 ISCOM
D	试验 3 组 LOC3	Lipase + LTB + ISCOM

### 1.4 样品采集

1.4.1 小鼠乳样和血样的采集 采样前 4 h 让母鼠与幼鼠分开饲养, 采样时将小鼠麻醉, 仰卧固定。分别收集分娩后 8 d 和 12 d 血液及乳汁, 其中血液用于分离血浆 (5 000 r/min, 15 min), 血样和乳样均 -80℃ 保存。

1.4.2 小鼠乳腺组织的采集 分别在分娩后 8 d 和 12 d 进行乳腺取样, 每次采集 7~10 只小鼠。将采完乳样及血样的小鼠进行乳腺组织采集。沿正中线切开腹部皮肤直至耻骨后缘, 取小鼠蹊部乳腺组织, 放入液氮中保存。

### 1.5 小鼠血浆和乳中特异性 IgA 含量的测定

采用间接 ELISA (Bethyl Montgomery, TX, USA) 检测血浆及乳中特异性 IgA 含量, 以 Lipase 抗原包被酶标板捕获待检样品中的特异性 IgA, 以 1% 牛血清白蛋白 BSA (Sigma) 封闭液封闭 ELISA 板, 同时作为阴性对照, 以碱性磷酸酯 (AP) 酶标兔抗鼠 IgA (PROMEGA) 作为二抗, TMB 显色, 405 nm 测定 OD 值。以未免疫 Lipase 的小鼠血浆为阴性对照, (待检样品 OD - 空白对照 OD) / (阴性对照 OD - 空白对照 OD) ≥ 2 时判定为阳性。利用标准 IgA 建立 IgA 含量与 OD 值的函数关系, 用于计算样品 IgA 含量。

### 1.6 小鼠乳腺总 RNA 的提取及反转录

取约 0.1 g 小鼠乳腺组织, 加入 1 mL 裂解液, 用手持匀浆器进行匀浆处理, 总 RNA 的提取用 RNA simple 试剂盒法, 操作步骤按照说明书进行。将提取得到的总 RNA 在紫外分光光度计下测定其 OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub> 值, 检测 RNA 的纯度并计算含量, 并跑 0.8% 琼脂糖凝胶电泳。

**1.7 Real Time-PCR检测乳腺 *pIgR* 基因的表达**

1.7.1 引物及反应条件 设计合成小鼠内参基因引物 GAPDH: G1-5'-CGTGCCGCCTGGAGAAACCTG-3', G2-5'-AGAGTGGGAGTTGCTGTTGAAGTCG-3', 目的片段长度为 140 bp *pIgR* 特异性引物: P1-5'-CAC-CTGGAGAGAAGGAAGTAG-3', P2-5'-GTAGTAGCACGTGATGGAAAC-3', 目的片段长度为 209 bp

PCR反应体系建立如下: 模板 cDNA 1 μL, 上下游引物 (10 μmol/L)各 0.5 μL, PCR mix 10 μL, 灭菌水 8 μL。PCR反应程序为: 94℃ 4min, 35个循环: 94℃变性 30 s, 60℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 72℃ 7 min。

1.7.2 Real Time-PCR扩增效率的检验及反应体系 本试验应用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法对目标基因的 mRNA 表达量进行相对定量<sup>[4]</sup>, 对 cDNA 样本作倍比稀释后, 定量测定, 计算目标基因和内标基因的  $\Delta Ct$ 值, 以 cDNA浓度梯度的对数 (lg)值对  $\Delta Ct$ 值作图。

1.7.3 *pIgR* 基因的 mRNA表达量 根据  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法对目标基因的 mRNA 表达量进行相对定量。每个

样品做 3个重复。比较注射不同疫苗处理组小鼠乳腺中 *pIgR* 基因的表达量。

1.8 数据统计分析

数据首先采用 Excel进行整理, 然后用 SAS 9.0 进行方差分析和显著性检验, 采用 Duncan法进行多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 小鼠乳腺总 RNA 的提取效果及其引物的 PCR 检测

将乳腺组织总 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳 (90 V, 40 min) 检查, 发现有 2条清晰的、无拖尾的带 (图 1-A), 即 18 S rRNA 和 28 S rRNA。通过凝胶成像系统软件分析, 根据 DNA Marker标准含量得出 28 S rRNA 的含量是 335 ng, 18 S rRNA 的含量是 161 ng, 即 28 S rRNA 的含量约为 18 S rRNA 含量的 2倍。目的基因和内参基因引物的特异性, 见图 1-B, 表明这两对引物的特异性较高。

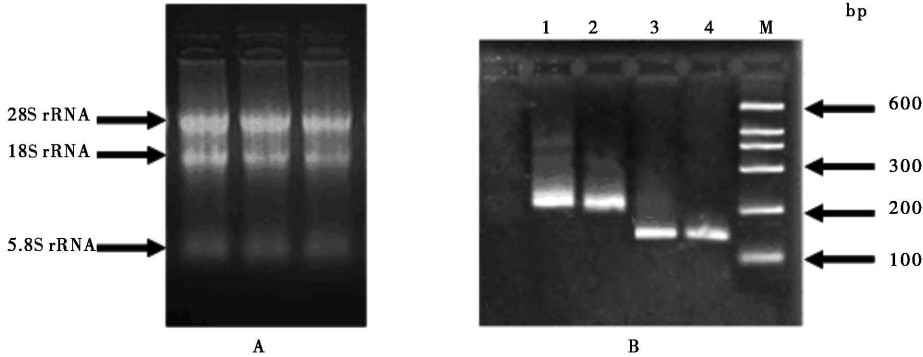


图 1 小鼠乳腺总 RNA 的提取效果 (A)和 *pIgR* 基因 (B 1、2)、内参基因 (B 3、4) 的 PCR 电泳

Fig 1 The electrophoresis of total RNA (A) and amplification of the *pIgR* gene (B 1, 2) and reference genes (B 3, 4)

2.2 小鼠乳腺中特异性 IgA 含量的变化

不同疫苗处理对小鼠血浆和乳中的特异性 IgA 含量的影响见表 2。由表 2 可以看出, 各组血浆中特异性 IgA 水平差异不显著 ( $P < 0.05$ ), B 组 (Lipase +

pase+ 灭菌生理盐水) 和 D 组 (Lipase + LTB + ISCOM) 的分娩后 12 d 乳中特异性 IgA 水平显著高于 ( $P < 0.05$ ) 分娩后 8 d 的乳中的特异性 IgA 水平。

表 2 小鼠免疫刺激后血浆及乳中特异性 IgA 的含量

Tab 2 The specific IgA concentration in plasma and milk after mouse immune stimulating					mg /mL
分组 Groups	血浆 Plasma		乳 Milk		
	8 d	12 d	8 d	12 d	
A	0.129 ± 0.028	0.130 ± 0.029	0.106 ± 0.022	0.093 ± 0.004	
B	0.112 ± 0.044	0.111 ± 0.005	0.101 ± 0.019 a	0.198 ± 0.020 b	
C	0.120 ± 0.015	0.115 ± 0.025	0.093 ± 0.004	0.095 ± 0.007	
D	0.098 ± 0.040	0.105 ± 0.014	0.097 ± 0.020 a	0.179 ± 0.018 b	

注: 同一行中标有不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ).  
Note: Within the same line, different letters represent the significant differences ( $P < 0.05$ ).

2.3 小鼠乳腺中 *pIgR* 基因的 mRNA 的表达量

2.3.1 Real time PCR扩增效率的检验 在不同稀释浓度下, 目的基因取 4个点做趋势图 (图 2), 结果

显示: ACC的趋势线为:  $y = 0.0608x + 3.2182$ , 斜率绝对值小于 0.1; 目标基因与内标基因的扩增效率符合  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  定量。

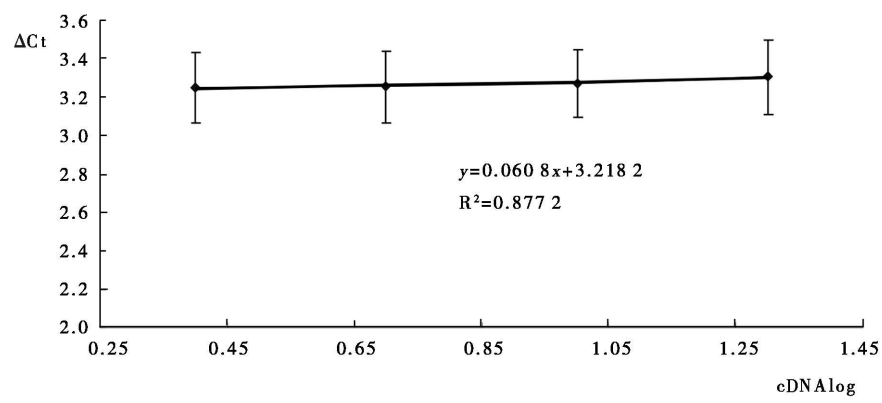
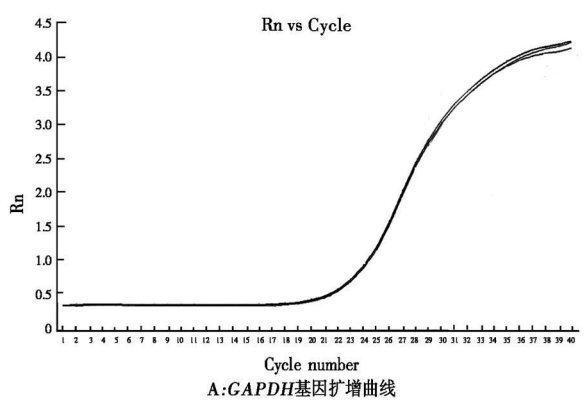


图 2 不同稀释浓度的 cDNA (log) 扩增效率图

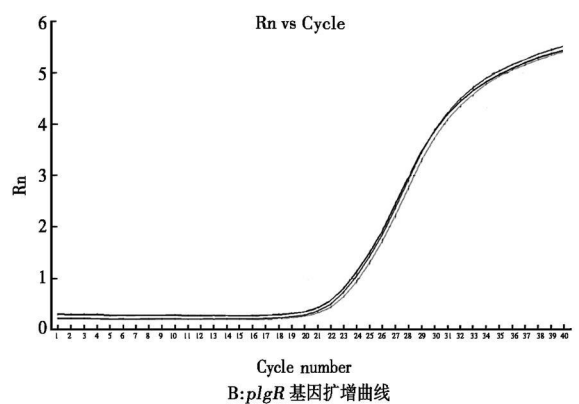
Fig 2 Efficiency of amplification at different cDNA concentrations ( log)

2 3 2 小鼠 *pIgR* 基因和 *GAPDH* 基因的扩增曲线及熔解曲线 图 3 为小鼠 *GAPDH* 基因和 *pIgR* 基因的扩增曲线图, 图 4 为小鼠乳腺所有样品的扩增曲

线图, 由图可知, 目的基因和内参基因的  $C_t$  值均在 18~30 之间, 扩增效果较好。



A: *GAPDH* 基因扩增曲线



B: *pIgR* 基因扩增曲线

图 3 小鼠 *GAPDH* 基因和 *pIgR* 基因的扩增曲线图

Fig 3 The amplification plot of mouse *GAPDH* gene and *pIgR* gene

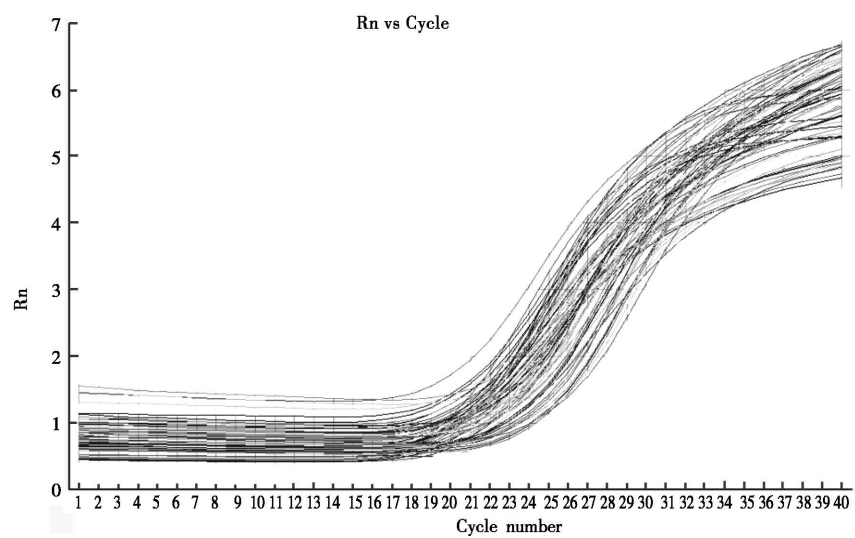


图 4 小鼠乳腺组织所有样品的 *pIgR* 基因扩增曲线

Fig 4 The amplification pbt of mouse *pIgR* gene of all samples

SYBR GREEN I 荧光定量 PCR 结束后, 仪器进行熔解曲线分析, 如图 5。由图可知, 目的基因和内

参基因的熔解曲线特异性较好, 无杂峰, 无引物二聚体的产生。

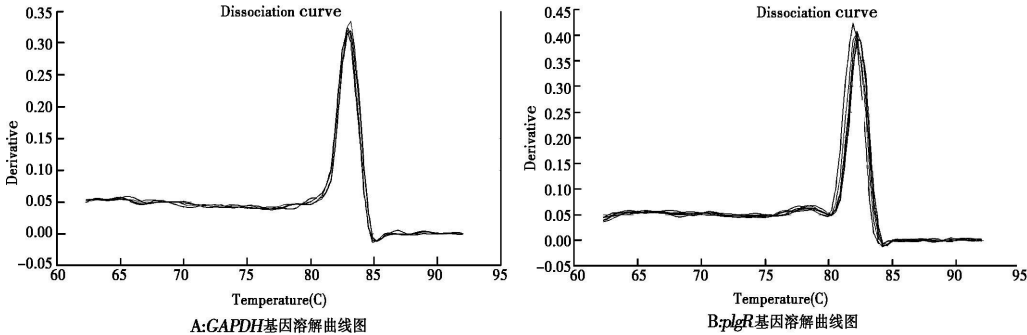


图 5 小鼠 *GAPDH* 基因和 *pIgR* 基因的熔解曲线图

Fig 5 The dissociation plot of mouse *GAPDH* gene and *pIgR* gene

2 3 3 小鼠乳腺中 *pIgR* 基因相对定量的结果 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  相对定量方法对各个疫苗处理的小鼠乳腺进行 Real Time PCR 定量分析, 定量结果见表 3。结

果表明, B 组和 D 组在分娩后 12 d 的乳腺中 *pIgR* 基因转录水平上升, 显著高于分娩后 8 d 的乳腺中 *pIgR* 基因转录水平 ( $P < 0.05$ )。

表 3 小鼠 *pIgR* 基因的 Real Time PCR 定量结果

Tah 3 The Real Time PCR results of mouse *pIgR* gene

分组 Groups	分娩后天数 /d After parturition	<i>pIgR</i> 基因 Ct <i>pIgR</i> gene Ct	<i>GAPDH</i> 基因 Ct <i>GAPDH</i> gene Ct	$\Delta C_t$ (Avg <i>pIgR</i> - Avg <i>GAPDH</i> )	$\Delta\Delta C_t$ (Avg LOC - Avg CK)	目的基因 相对表达量 Relative expression $2^{-\Delta\Delta C_t}$
A	8	20.27 ± 1.20	17.43 ± 1.13	2.60 ± 0.11	0.00 ± 0.11	1.0 (0.93 - 1.07)
	12	22.05 ± 2.19	19.40 ± 0.60	2.65 ± 0.13	0.00 ± 0.13	1.0 (0.91 - 1.09)
B	8	22.27 ± 1.14	19.71 ± 0.62	2.56 ± 0.09	-0.04 ± 0.09	1.03 (0.94 - 1.06) a
	12	23.19 ± 1.76	20.48 ± 1.38	2.08 ± 0.04	-0.57 ± 0.04	1.48 (1.45 - 1.51) b
C	8	22.73 ± 1.90	20.27 ± 1.32	2.46 ± 0.10	-0.14 ± 0.04	1.10 (1.07 - 1.13)
	12	22.27 ± 1.38	19.69 ± 1.34	2.57 ± 0.06	-0.08 ± 0.06	1.06 (1.02 - 1.10)
D	8	21.32 ± 1.25	18.70 ± 0.73	2.62 ± 0.04	0.02 ± 0.04	0.99 (0.96 - 1.02) a
	12	22.37 ± 1.00	19.99 ± 0.79	2.38 ± 0.03	-0.27 ± 0.03	1.31 (1.29 - 1.33) b

注: 同一组中标有不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Note: Within the same group, different letters represent the significant differences ( $P < 0.05$ ).

3 讨论

3 1 小鼠血浆和乳中特异性 IgA 含量的变化

本试验 B 组和 D 组分娩后 12 d 的乳中特异性 IgA 显著高于 8 d 的乳中的特异性 IgA ( $P < 0.05$ ), 而血浆中的特异性 IgA 含量差异不显著。B 组和 D 组分别注射 Lipase+ 灭菌生理盐水和 Lipase+ LTB + ISCOM。本试验使用的 LTB 是大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位, 它无毒性, 是迄今已知最强的粘膜免疫原和粘膜免疫佐剂, 有报道表明, LTB 具有复杂的免疫调节功能<sup>[5-7]</sup>。注射了不同疫苗的小鼠后, 活化了 B 细胞, 增殖分化为能分泌不同类别 Ig 的浆细胞, 合成并分泌抗体, 发挥特异性免疫效应<sup>[8]</sup>。免疫刺激复合物 (ISCOM) 是一种全面的抗原递呈系统, 对机体具有免疫增强和抗原递呈双重功能, 能同时刺激体液免疫及细胞免疫<sup>[8,9]</sup>。ISCOM 疫苗能显著增强 T 细胞增殖、分化, 诱导多种亚型 (IgG、IgG<sub>2a</sub>、IgG<sub>2b</sub> 及 IgG<sub>1</sub>) 的特异性抗体产生, 引起多种动物对多种抗原产生高滴度的抗体应答, 且引起的应答通常出现时间早, 持续时间长, 抗

体水平高, 所需抗原量少, 并且不受已存在抗体或母源抗体的影响。B 组和 D 组注射的疫苗均含有 Lipase 抗原, 所以乳中的抗 Lipase 的 IgA (特异性 IgA) 的水平较高。

3 2 小鼠乳腺中 *pIgR* 基因的 mRNA 转录水平的变化

Groot 等<sup>[10]</sup>研究了鼠的 *pIgR* 基因在转基因小鼠的乳腺中过度表达影响了乳的成分, 使转基因小鼠乳中的 31 kDa 蛋白缺失而 11 kDa 蛋白出现, 其中消失的 31 kDa 蛋白被认为是  $\kappa$ -酪蛋白, 新出现的 11 kDa 蛋白是血清淀粉状蛋白 A-l。Rincheval-Amolle 等<sup>[11]</sup>研究了 *pIgR* 基因在绵羊乳腺中的表达及其调控, 指出 *pIgR* 基因 mRNA 在绵羊分娩后第 3 天表达达到最高水平。更深入的试验研究表明, 激素 (如泌乳刺激素和糖皮质激素) 的循环和局部产生细胞因子 (如 NF- $\gamma$ ) 能提升 *pIgR* 基因的表达水平<sup>[11]</sup>。Tjallingii 等<sup>[12]</sup>通过对小鼠的 *pIgR* 基因敲除, 发现小鼠的呼吸道对分枝杆菌易感。Rabot 等<sup>[13]</sup>用脂多糖处理体外培养的牛乳腺上皮细胞, 发现 *pIgR* 的 mRNA 的表达在处理 3 h 增加而 6 h 恢

复到正常水平。

本试验采用 RealTime-PCR 方法来研究小鼠乳腺组织中 *pIgR* 基因的 mRNA 转录变化,目前常用的相对定量方法多采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[4]</sup>。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法可以高通量分析大量基因,但其定量结果容易受到基因扩增效率的影响,同时引入内参基因,又容易受到内参基因表达本身的影响。

本试验 B 组和 D 组的分泌后 12 d 乳腺中 *pIgR* 基因的 mRNA 的表达量增加,与对照组 A 相比,分别增加了 48% 和 31%。这与 B 组和 D 组分娩后 12 d 乳中特异性 IgA 的含量上升的结果相一致,这表明了 *pIgR* 基因的 mRNA 转录的增加,使得 *pIgR* 分子的数量增加, IgA 跨膜转运进入乳中的水平提高,所以乳中的 IgA 含量增加。

## 4 结论

小鼠经免疫刺激,在分娩后 12 d 的乳腺中 *pIgR* 基因的表达量上升,显著高于 8 d 的乳腺中的表达量,这与小鼠乳中特异性 IgA 的变化规律一致。因此,乳腺中 *pIgR* 基因表达量增加可以提高乳中特异性 IgA 的水平,进一步证实了 *pIgR* 能介导 IgA 分泌进入乳中。

## 参考文献:

- [1] Kraehenbuhl J P, Neutra M R. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces[J]. *Physiology Review*, 1992, 72: 853–879
- [2] Mostov K E. Trans epithelial transport of immunoglobulins [J]. *Annual Review of Immunology*, 1994, 12: 63–84
- [3] De Groot N, Van Kuik-Romeijn P, Lee S H, *et al*. Increased immunoglobulin a levels in milk by over-expression the murine polymeric immunoglobulin receptor gene in the mammary gland epithelial cells of transgenic mice [J]. *The Journal of Immunology*, 2000, 101 (2): 218–224
- [4] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene ex-

- pression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402–408
- [5] Millar D G, Hint T R, Snider D P. *Escherichia coli* heat labile enterotoxin B subunit is a more potent mucosal adjuvant than its closely related homologue the B subunit of cholera toxin [J]. *Infection Immunology*, 2001, 69 (5): 3476–3482
- [6] Williams N, Hirst T, Nashar T. Immunomodulation by the cholera like enterotoxins from adjuvant to therapeutic [J]. *Immunology Today*, 1999, 20 (2): 95–101
- [7] Scerbo M J, Rupil L L, Babin M J *et al*. Protective mucosal immunity to ocular herpes simplex virus type 1 infection in mice by using *Escherichia coli* heat labile enterotoxin B subunit as an adjuvant [J]. *Virology*, 2001, 75 (4): 1664–1671
- [8] 杨汉春. 动物免疫学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003: 111–139
- [9] Anders S, John C C, Ian G B. ISCOMs: an adjuvant with multiple functions [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 1998, 12: 713–723
- [10] de Groot N, van Kuik-Romeijn P, Lee S H, *et al*. Overexpression of the murine *pIgR* gene in the mammary gland of transgenic mice influences the milk composition and reduces its nutritional value [J]. *Transgenic Research*, 2001, 10 (4): 285–291
- [11] Rincheval-Amold A, Belair L, Djane J. Developmental expression of *pIgR* gene in sheep mammary gland and hormonal regulation [J]. *Journal of Dairy Research*, 2002, 69: 13–26
- [12] Tjand A, Rodríguez A, Cardona P J, *et al*. Polymeric IgR knockout mice are more susceptible to mycobacterial infections in the respiratory tract than wild type mice [J]. *International Immunology*, 2006, 18 (5): 807–816
- [13] Rabot A, Welhiz O, Meyer H H, *et al*. Use and relevance of a bovine mammary gland explant model to study infection responses in bovine mammary tissue [J]. *Journal of Dairy Research*, 2007, 74 (1): 93–99