

重组大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位 在鸭体内的吸收代谢及组织分布

周晓丽^{1,2}, 王一成¹, 姜平², 袁秀芳¹, 李军星¹, 杜晓莉^{1,3}

(1. 浙江省农业科学院 畜牧兽医研究所, 浙江 杭州 310021; 2. 南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095;
3. 甘肃农业大学, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 研究重组大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位 (rLTB) 在鸭体内的吸收代谢及组织分布, 为 rLTB 的临床应用安全性提供依据。试验鸭分别肌注 1, 50, 100 mg/kg rLTB 后, 以神经节苷脂 GM1 酶联免疫吸附法 (GM1-ELISA) 测定注射后不同时间点鸭血清中的 rLTB 含量; 连续 3 次肌注 rLTB 后, 观察临床症状和剖检病理变化, 并采集心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏和大脑制备组织切片, HE 染色观察组织病理学变化, 免疫酶组织化学染色观察 rLTB 在各脏器内的分布及含量变化。结果表明: 鸭血清中的 rLTB 含量变化及维持时间与 rLTB 注射剂量呈正相关。1 mg/kg 注射组 2 h 达到峰值, 维持至 6 h 开始下降, 24 h 后基本检测不到; 50, 100 mg/kg 注射组分别于 2 h 和 1 h 达到峰值, 并均维持至 12 h 才开始下降, 48 h 后基本检测不到。HE 染色切片显示 50 mg/kg 注射组肝细胞轻度浊肿变性, 肺脏轻微炎症; 100 mg/kg 注射组肝细胞浊肿变性明显, 肺脏重度炎症, 脑组织出现局灶性坏死。免疫组化染色结果显示, 在被检脏器中均检出 rLTB, 以大脑含量最高, 脾脏和肝脏次之, 心脏和肺脏检出量低。rLTB 大剂量肌肉注射可引起鸭一定的组织学病变, 对鸭的安全使用剂量应不超过 50 mg/kg。

关键词: 大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位; 鸭; 吸收代谢; 组织分布

中图分类号: S834 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2014)02-0104-06

Dynamic and Distribution of Recombinant *E. coli* Heat-labile Enterotoxin B Subunit in Duck

ZHOU Xiao-li^{1,2}, WANG Yi-cheng¹, JIANG Ping²,
YUAN Xiu-fang¹, LI Jun-xing¹, DU Xiao-li^{1,3}

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinarian, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; 2. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: *E. coli* heat-labile enterotoxin B subunit (rLTB) exerts most effective adjuvant effects on mucosal immune responses. In order to elucidate the dynamic and the safety of rLTB for clinical use in duck, the concentrations of rLTB in sera, histopathological changes and tissue distribution of rLTB were examined. Ducks were bled prior to injection and at different time intervals post-intramuscular injection (IM) with 1, 50, 100 mg/kg rLTB, respectively. GM1-ELISA was applied for the determination of rLTB concentration in sera. The autopsy of ducks was conducted at different time points after IM of rLTB once a day, 3 times in a row. Samples of heart, liver, spleen, lung, kidney and brain were fixed in 10% paraformaldehyde and the tissue sections were examined after coloration with haematoxylin and eosin (HE) or immunohistochemical (IHC) staining. The result showed that there was positive correlation between concentration and duration of rLTB in sera and the dosages of application. In 1 mg/kg group the amount of rLTB peaked at 2 hour post injection (HPI), and started to decline at 6 HPI, and could not be detected at 24 HPI. In 50 mg/kg group and 100 mg/kg group the peak were achieved at 2 HPI and 1 HPI, respectively and began

收稿日期: 2013-10-26

基金项目: 浙江省重点科研农业项目 (2006C22049); 浙江省重大科技专项重点农业项目 (2012C12009-1)

作者简介: 周晓丽 (1986-), 女, 河南南阳人, 在读硕士, 主要从事传染病预防和控制研究。

通讯作者: 王一成 (1957-), 男, 浙江温岭人, 研究员, 硕士生导师, 主要从事传染病预防和控制研究。

to decrease at 12 HPI, and beyond the detection limit at 48 HPI. The slight cloudy swelling and degeneration of hepatocellular, inflammatory cell infiltration in lung were observed in 50 mg/kg group ducks. Obvious cloudy swelling and degeneration of hepatocellular, severe inflammatory cell infiltration in lung and focal necrosis in brain tissue were observed in 100 mg/kg group. IHC staining results showed that rLTB was detected in all 6 kinds of examined organs and the highest amount rLTB was observed in brain. The conclusion is that the high dosage of rLTB may cause histological lesions and the rLTB should be used under 50 mg/kg for safe in duck.

Key words: *E. coli* heat-labile enterotoxin B subunit (LTB); Duck; Dynamic; Distribution

大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位 (Heat-labile enterotoxin B subunit, LTB) 是由肠产毒性大肠杆菌 (Enterotoxigenetic *E. coli*, ETEC) 分泌的一种热不稳定性 (65 °C, 30 min 即失活) 外毒素的组成部分。LTB 可介导大肠杆菌肠毒素与靶细胞膜上的神经节苷脂 GM1 受体结合, 具有黏膜佐剂活性^[1]。

随着对 LTB 黏膜佐剂特性研究的不断深入, LTB 在疫苗研究中的应用越来越广泛。小鼠鼻内免疫重组单纯疱疹病毒 1 型 (HSV-1) 糖蛋白 D (gD) 加 LTB 后, 可产生分泌型抗 gD IgA 和血清 IgG 抗体, 而且抗体水平与 HSV-1 自然感染小鼠产生的抗体水平相当^[2]。舌下免疫福尔马林灭活的流感病毒 A/PR/8 (H1N1) 加 mCTA/ LTB, 可增强分泌 IFN- γ 的 T 细胞应答和病毒特异性 CTL 应答, 免疫小鼠可完全抵抗 A/PR/8 活病毒的鼻内致死性攻毒^[3]。Chen 等^[4]将 LTB 与小鼠 BCL1 B 细胞淋巴瘤独特型免疫球蛋白抗原 (Id) 单链 Fv 序列连接。LTB-BCL1 scFv 融合蛋白保留了与神经节苷脂 GM1 结合的能力, 小鼠免疫 LTB-BCL1 scFv DNA 可产生高水平的 Id 特异性抗体, 并可抵抗致死性肿瘤的攻击。小鼠口服免疫融合蛋白猪细小病毒 VP2-LTB 可显著增强黏膜和体液免疫反应^[5]。

目前, 一些含 LTB 的疫苗已经进入了临床试验阶段, 如我国第三军医大学邹全明等^[6]研制的口服重组 UreB + LTB 融合疫苗已完成 III 期临床试验, 结果证实疫苗预防幽门螺杆菌感染的有效率为 72%, 特异性抗体阳性率为 85%; Byung Woo 等^[7]构建的 LTB-JOL1229 疫苗口服免疫鸡, 结果表明, LTB 可显著提高鸡对禽伤寒的免疫保护力。浙江省畜牧兽医研究所畜禽疫病防控研发中心将 rLTB 与禽流感灭活疫苗同时免疫鸭, 极大地提高了禽流感灭活疫苗的免疫力 (资料未显示)。然而 LTB 可能通过嗅觉神经直接逆行运输至脑部, 存在着潜在危险^[8-9], 因此, 需要对 rLTB 作为免疫佐剂的安全性进行评价。本研究通过对 rLTB 在鸭体内消长代谢及病理组织学和组织分布及含量变化的研究, 以期探索 rLTB 在鸭体内的消长规律和 rLTB 的安全应用依据。

1 材料和方法

1.1 rLTB 的制备

以本实验室所构建的 *P. pastoris* GS115-pPIC9K-LTB 重组菌株为菌种, 利用自动发酵罐进行 rLTB 的表达^[10]。控制发酵表达条件为: pH 值 6.0, 温度 30 °C, 溶解氧 30% 和 15%, 质量浓度为 15 g/L 的甲醇初始添加浓度为 1% (V/V), 诱导表达 96 h。将 LTB 表达液先经硫酸铵沉淀去除大部分杂蛋白, 再在 AKTA™ FPLC 快速蛋白纯化系统上进行层析过柱 (HiTrap™ Ni²⁺ 螯合柱)。rLTB 的使用浓度为 15 mg/mL。

1.2 试验动物

40 日龄、体重 1 kg 左右的临床健康麻鸭。

1.3 主要仪器及试剂

Model 550 酶标微板读数仪 (spectraMax M5) 购自 Molecular Devices; OLYMPUS BX51 型光学显微镜及数码成像装置购自日本 OLYMPUS 光学工业株式会社。

辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG 购自武汉博士德生物有限公司; LTB 单克隆抗体由本实验室制备保存^[11]; 免疫组化检测盒 (二步法 EnVision™ 试剂盒) 购自丹麦 DAKO 公司; 封闭用正常山羊血清和其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.4 rLTB 在鸭体内的吸收代谢

1.4.1 动物分组、免疫以及生物样品采集与处理

麻鸭随机分为 3 个试验组和 1 个对照组, 每组 10 只。试验组分别肌肉注射 1, 50, 100 mg/kg rLTB, 对照组肌肉注射 PBS。各剂量组均于注射后 0, 0.5, 1, 2, 6, 12, 24, 48, 60 h 在注射对侧腿静脉采集血样, 全部血样均于凝固后离心获得血清, 血清样品于 -30 °C 保存待测。

1.4.2 GM1-ELISA^[12] 检测鸭血清中的 rLTB 浓度

将 GM1 用碳酸盐缓冲液以 1 μ g/mL 包被 96 孔酶标板, 每孔 100 μ L, 4 °C 过夜 18 h; PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 吸水纸吸干; 每孔加入 200 μ L 5% 的脱脂奶, 37 °C 封闭 2 h, 洗涤同上。每个样品做 2 个重复, 纯化的 LTB 稀释液作为阳性对照, 阴性血清作

为阴性对照,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,洗涤同上。LTB 单克隆抗体按 1:500 倍稀释,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,洗涤同上。将 HRP 标记的羊抗鼠二抗按 1:5 000 倍稀释,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,洗涤同上。每孔加入 TMB 底物 100 μ L,显色 10 min 后加入 2 mol/L H_2SO_4 终止反应,每孔 100 μ L;置酶标仪读取 450 nm 的光吸收值。

1.5 rLTB 对鸭的病理组织学及其在鸭体内组织分布

1.5.1 动物分组、免疫以及生物样品采集与处理
麻鸭随机分为 3 个试验组和 1 个对照组,每组 10 只。试验组分别肌肉注射 1,50,100 mg/kg rLTB,对照组肌肉注射 PBS。各组同剂量连续注射 3 次,每天 1 次。观察临床症状,剖检死亡或濒临死亡鸭,并于第 3 次注射后第 1,14,28 天各组扑杀 2 只,对照组扑杀 1 只,观察各个组织器官的病变情况;分别采集心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏和大脑共 6 个组织器官,在 10% 多聚甲醛中固定,常规法制作石蜡切片。

1.5.2 HE 染色和免疫组化染色及观察
对所有组织器官石蜡切片进行 HE 染色及观察^[13],同时对 50 mg/kg 注射组试验鸭组织器官进行免疫组化染色及观察。免疫组化检测具体步骤参照免疫组化检测盒说明书进行。染色观察结果于显微数码图像采集系统上采集图像并分析。根据阳性细胞的数量和显色强度来判定染色结果:“-”表示阴性,无显色;“+”表示弱阳性,阳性细胞 $\leq 25\%$,显色较弱;“++”表示阳性,阳性细胞 $\leq 50\%$,但 $> 25\%$,显色清晰;“+++”表示强阳性,阳性细胞 $> 50\%$,显色清晰。

2 结果与分析

2.1 rLTB 在鸭体内的吸收代谢

用 GM1-ELISA 测定鸭血清中 rLTB 的浓度。以本实验室提纯的 rLTB 作为标准蛋白进行标准曲线

的绘制。结果显示,rLTB 在鸭血清中的含量变化及维持时间与注射剂量呈正相关,100 mg/kg 注射组鸭体内 rLTB 浓度上升快,1 h 左右达到峰值,含量约为 14 μ g/mL;50 mg/kg 注射组 rLTB 浓度 2 h 左右达到峰值,含量约为 8 μ g/mL,2 组均维持至 12 h 开始下降,48 h 降至很低的水平;1 mg/kg 注射组 rLTB 浓度 2 h 左右达到峰值,含量约为 1 μ g/mL,6 h 开始下降,24 h 已降至底线(图 1)。

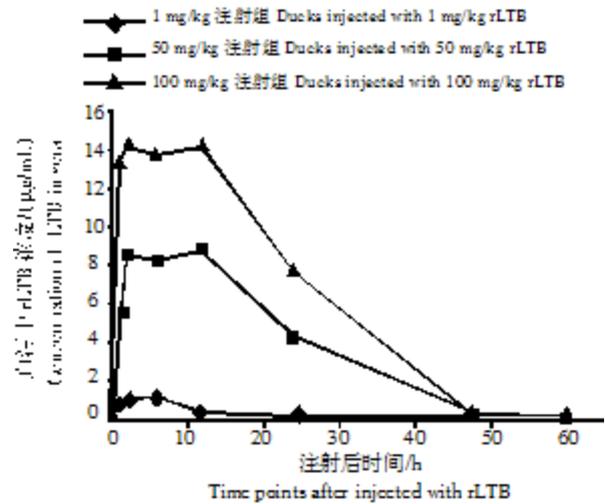
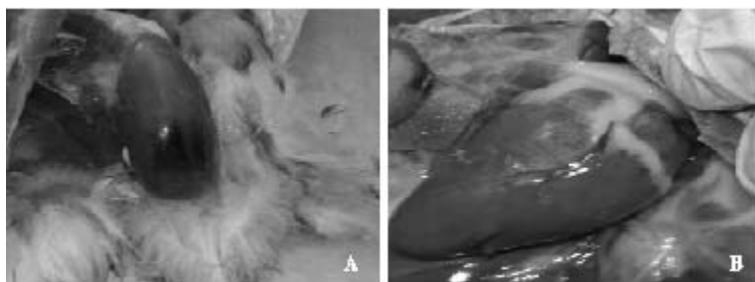


图 1 鸭血清中 rLTB 浓度随时间变化的曲线

Fig.1 Serum clearance of rLTB in injected duck

2.2 免疫鸭的临床症状和病理剖检变化

临床观察显示,连续注射 3 次后,1 mg/kg 注射组没有出现可见的临床症状;50,100 mg/kg 注射组体温稍有上升(数据未显示),精神沉郁,饮食稍有下降,于注射后 7 d 内完全恢复。注射部位均出现红肿,并逐渐消退。100 mg/kg 注射组有脖颈扭曲等神经症状出现。病理剖检观察显示各剂量组注射部位肌肉呈不同程度瘀血状态(如图 2-A),100 mg/kg 注射组试验鸭可见心冠脂肪沟有点状出血(如图 2-B),其他组织器官未观察到可见病变。



A.50 mg/kg 注射组注射部位肌肉淤血; B.100 mg/kg 注射组心冠脂肪沟点状出血。

A. Congestion in musculature of duck injected with 50 mg/kg rLTB;
B. Punctate hemorrhages in heart of duck injected with 100 mg/kg rLTB.

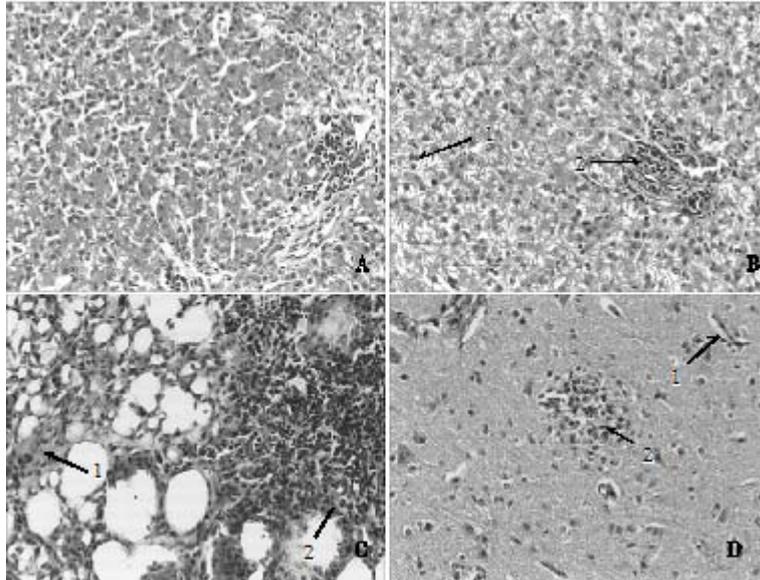
图 2 免疫鸭部分组织器官病理剖检变化

Fig.2 Pathological changes of partial organs in inject duck

2.3 病理组织学变化

在各剂量组中,心脏、脾脏、肾脏均未见明显的病理变化(表1)。肝脏 1 mg/kg 注射组没有明显病理变化;50 mg/kg 注射组可见肝细胞轻度浊肿变性和汇管区少量炎症细胞浸润;而 100 mg/kg 注射组可见肝细胞质淡染,肝细胞浊肿变性明显,肝血窦变小,细胞结构破坏,呈丝网状结构,汇管区炎症细胞

浸润(如图 3-A、B)。肺脏 1,50 mg/kg 注射组均未见明显病理变化;100 mg/kg 注射组可见肺泡壁毛细血管形态扩张瘀血,充满大量红细胞,间质发生大量的炎症细胞浸润(如图 3-C)。大脑 1,50 mg/kg 注射组均未见明显病理变化;100 mg/kg 注射组可见脑内血管扩张、充血、水肿以及局灶性炎症细胞浸润和坏死(如图 3-D)。



A. 50 mg/kg 注射组肝细胞轻度浊肿变性;B. 100 mg/kg 注射组肝细胞浊肿变性明显,肝血窦变小(标记1),汇管区炎症细胞浸润(标记2);C. 100 mg/kg 注射组肺泡壁毛细血管形态扩张瘀血(标记1),肺间质大量炎症细胞浸润(标记2);D. 100 mg/kg 注射组脑内血管扩张、充血、水肿(标记1)及局灶性炎症细胞浸润和坏死(标记2)。

A. Slight cloudy swelling degeneration hepatocellular in 50 mg/kg injected duck; B. Severe cloudy swelling degeneration hepatocellular and smaller hepatic sinusoid (Marker 1), inflammatory cell infiltration at portal area in 100 mg/kg injected duck (Marker 1); C. Alveolar wall thickening (Marker 1), a large number of inflammatory cell in interstitial tissue (Marker 2) in 100 mg/kg injected duck; D. Edema in the brain blood vessels (Marker 1), focal inflammatory cell infiltration and necrosis (Marker 2) in 100 mg/kg injected duck.

图3 免疫鸭部分组织器官的病理变化(100×)

Fig. 3 Histopathological changes in rLTB injected duck (100 ×)

表1 不同剂量 rLTB 免疫后各器官的组织病理观察统计

Tab. 1 The pathological changes of organs in ducks injected with rLTB

rLTB 剂量 /(mg/kg) Dosage of rLTB	组织病理观察 Pathological changes of organs					
	心脏 Heart	肝脏 Liver	脾脏 Spleen	肺脏 Lung	肾脏 Kidney	大脑 Brain
1	无	无	无	无	无	无
50	无	轻度 变性	无	轻度 炎症	无	无
100	无	变性 明显	无	重度 炎症	无	局灶性 坏死

2.4 试验鸭组织中 rLTB 的分布

免疫组化染色见 50 mg/kg 注射组鸭的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏和大脑中均检出 rLTB。各组织中的 rLTB 含量以大脑最高、脾脏和肝脏次之,心脏和肺脏检出量极低。其中肝脏的 rLTB 检出量在注射后 14 d 较注射后 1 d 有所增加,28 d 减少;脾脏和大脑的 rLTB 检出量随时间的持续而逐渐减少;肾脏

的抗原检出量没有变化(表2、图4)。

表2 rLTB 注射后不同时间点各组织器官免疫组化阳性染色强度

Tab. 2 Signal intensity of IHC staining in different organs at different time point

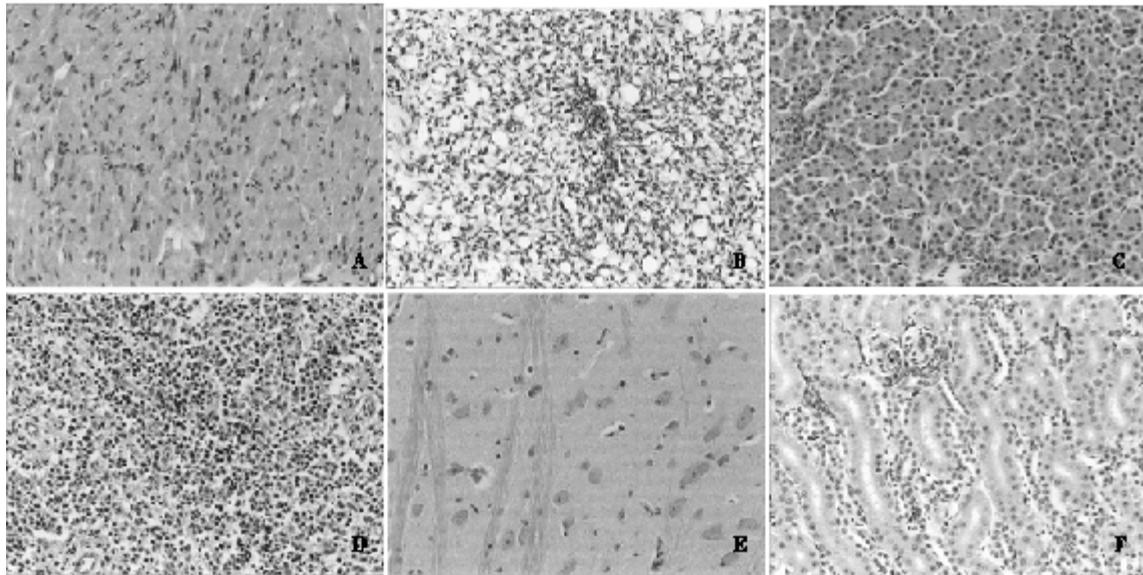
组织器官 Organs	rLTB 注射后的时间 Time points after injection			
	对照	1 d	14 d	28 d
心脏 Heart	-	-	+	-
肺脏 Lung	-	+	-	-
肝脏 Liver	-	+	++	+
脾脏 Spleen	-	++	++	+
大脑 Brain	-	+++	++	-
肾脏 Kidney	+++	+++	+++	+++

注: - . 阴性; + . 弱阳性; ++ . 阳性; +++ . 强阳性。

Note: - . Negative; + . Weak positive; ++ . Positive; +++ . Strong positive.

3 讨论

目前,国内外已进行了大量有关 rLTB 表达及其



A. 注射后 28 d, 心肌, 弱阳性; B. 注射后 28 d, 肺脏, 弱阳性; C. 注射后 14 d, 肝脏, 阳性;
 D. 注射后 1 d, 脾脏, 阳性; E. 注射后 1 d, 大脑, 强阳性; F. 对照组肾脏近曲小管胞浆, 强阳性。
 A. IHC staining of 28 d-PI heart tissue showing rLTB weak positive; B. IHC staining of 28 d-PI lung tissue showing rLTB weak positive;
 C. IHC staining of 14 d-PI liver tissue showing rLTB positive; D. IHC staining of 28 d-PI spleen tissue showing rLTB positive;
 E. IHC staining of 1 d-PI brain tissue showing rLTB Strong positive; F. IHC staining of control kidney tissue showing rLTB strong positive.

图 4 免疫鸭部分组织器官的免疫组化染色 (100 ×)

Fig. 4 Immunohistochemical (IHC) staining of partial organs in injected duck (100 ×)

作为黏膜免疫佐剂的研究,如崔文禹等^[14]在大肠杆菌中成功表达 rLTB,纯化的 LTB 具有良好的黏膜免疫佐剂活性;Rezaee 等^[15]使用半乳糖进行诱导,在酿酒酵母中表达的 rLTB 具有与野型 LTB 同样的抗原性;作为免疫佐剂,LTB 在与多种抗原经不同途径共免疫时,均能明显增强共免疫抗原诱导的黏膜分泌型 IgA 和血清 IgG 应答。LTB 诱导的免疫应答较霍乱毒素更为全面均衡,为 Th1 和 Th2 混合型应答^[16]。而关于 rLTB 的体内代谢、毒副作用等临床应用安全性方面的研究尚未见报道。

具有生物活性蛋白的药代动力学和组织分布是一个新的研究热点,目前还没有广泛研究,蛋白微量水平研究还较困难。有关基因工程产品的药代动力学,目前多采用同位素标记(主要是碘标法^[17])法进行研究。但是用碘标法得到的结果必须采用某些辅助手段来证实放射性来自完整的具有生物活性的蛋白,而不是其他代谢片段或降解产物。Hilton 等^[18]用抗原捕获 ELISA 成功地检测了重组鸡 IL-2 注射鸡体内后的消长规律。蔡永明等^[19]采用酶联免疫法研究了注射用重组人胸腺肽 $\alpha 1$ 的猕猴药动学。本试验运用 GM1-ELISA 成功检测了 rLTB 肌注射鸭后在鸭体内的消长动态,检测的灵敏度达到 25 pg/mL(资料未显示)。免疫增强剂的免疫增强效果与其在体内的维持时间有很大关系。本研究结果表明,rLTB 在鸭血清中的消长规律均依赖于使用剂量,高剂量组鸭体内 rLTB 浓度上升快,维持时间长,

消除速度慢。但 Geferson Fischer 等^[20]研究发现,小鼠肌肉注射 rLTB 剂量越大,诱导的 rLTB 抗体水平越高,其佐剂活性就越低。而能够在体内诱发其生物活性的 rLTB 维持时间和浓度仍有待研究。

Lazorova 等^[21]应用碘标法对 LTB 口服免疫后的小鼠肠道组织分布做了详细的研究,但对于全身性重要器官组织的分布没有进行研究。本研究采用免疫组化法研究了 rLTB 在鸭体内的组织分布情况,对免疫后不同时间点采取的试验鸭心、肝、脾、肺、肾和大脑的组织分布动态研究揭示了在所检测的 6 个器官中,rLTB 主要分布于脾、肝和脑中,且以大脑含量最高,这与神经节苷脂在各脏器的分布^[22]一致。肾脏近曲小管上皮细胞包括对照组的各试验组中均呈现阳性结果,可能鸭肾脏近曲小管上皮细胞胞浆内含有某种成分与 rLTB 单抗有交叉反应,有待进一步研究。结合临床症状和组织病理学观察可见高剂量 rLTB 注射后引起脑部病变,推测 rLTB 可经由神经末梢摄取逆向运输至脑神经元中,类似于狂犬病毒^[23]、破伤风毒素^[24]从外周向中枢神经系统传输的机制,而具体的作用机制仍需探讨。肝脏枯否氏细胞吞噬血液中的 rLTB 后,可能分泌某些细胞因子,或其吞噬功能降低,从而导致肝细胞损伤^[25]。高剂量 rLTB 注射组肺间质增生,大量淋巴细胞浸润,推测 LTB 作为外源性蛋白,可能引发过敏性肺炎^[26]。

本研究对 rLTB 在鸭体内的消长规律及组织分

布进行了初步的研究, rLTB 肌注鸭后广泛分布于鸭受检组织器官中, 组织病理学变化严重程度与 rLTB 的使用剂量和抗原检出量相关。对鸭的安全使用剂量不应超过 50 mg/kg。

参考文献:

- [1] Brenda D Spangler. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin [J]. *Microbiological Reviews*, 1992, 56: 622 – 647
- [2] Hazama M, Mayumi-Aomo A, Miyazaki T, et al. Intranasal immunization against herpes simplex virus infection by using a recombinant glycoprotein D fused with immunomodulating proteins, the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and interleukin-2 [J]. *Immunology*, 1993, 78(4): 643 – 649.
- [3] Song J H, Nguyen H H, Cuburu N, et al. Sublingual vaccination with influenza virus protects mice against lethal viral infection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(5): 1644 – 1649.
- [4] Chen C G, Lu Y T, Lin M, et al. Amplification of immune responses against a DNA-delivered idiotypic lymphoma antigen by fusion to the B subunit of *E. coli* heat labile toxin [J]. *Vaccine*, 2009, 27(32): 4289 – 4296.
- [5] Diqiu Liu, Xiangqing Wang, Junwei Ge, et al. Comparison of the immune responses induced by oral immunization of mice with *Lactobacillus casei*-expressing porcine parvovirus VP2 and VP2 fused to *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protein [J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2011, 34: 73 – 81.
- [6] 邹全明. 细菌性疫苗研究进展 [A] // 中华预防医学会/中华医学会微生物学与免疫学分会. 第三次全国免疫诊断暨疫苗学术研讨会论文集 [C]. 南京: 中华预防医学会/中华医学会微生物学与免疫学分会, 2007: 10 – 13.
- [7] Byung Woo Jeon, Chetan V Jawale, et al. Attenuated salmonella gallinarum secreting an escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit protein as an adjuvant for oral vaccination against fowl typhoid [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2012, 150: 149 – 160.
- [8] Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, et al. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(9): 896 – 903.
- [9] van Ginkel F W, Jackson R J, Yuki Y, et al. Cutting edge: the mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into olfactory tissues [J]. *J Immunol*, 2000, 165(9): 4778 – 4782
- [10] 王朝文. 大肠杆菌 LTb 增强 PRRSV-GP5 蛋白免疫原性的研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2010.
- [11] 刘 焕, 王一成, 袁秀芳, 等. 大肠杆菌 LTb 蛋白单克隆抗体的制备和鉴定 [J]. *浙江农业科学*, 2008(5): 617 – 620.
- [12] Bjorn Gustafsson, Roland Mollby. GM1 ganglioside enzyme-Linked immuno-sorbent assay for detection of heat-Labile enterotoxin produced by human and porcine *Escherichia coli* strains [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1982, 15(2): 298 – 301.
- [13] 何书海, 陈宏智, 焦凤超. 动物病理组织切片制作方法的改良 [J]. *动物医学进展*, 2011, 32(11): 130 – 132.
- [14] 崔文禹, 李媛媛, 单 璞, 等. 大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位的原核表达、纯化及其黏膜免疫佐剂作用 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2011, 24(12): 1417 – 1420.
- [15] Rezaee M A, Rezaee A, Moazzeni S M, et al. Expression of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit (LTB) in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Microbiol*, 2005, 43(4): 354 – 360.
- [16] McNeal M M, VanCott J L, Choi A H, et al. CD4 T cells are the only lymphocytes needed to protect mice against rotavirus shedding after intranasal immunization with achimeric VP6 protein and the adjuvant LT(R192G) [J]. *J Virol*, 2002, 76(2): 560 – 568.
- [17] 李丽立, 张 彬, 印遇龙, 等. 金属硫蛋白在仔猪体内代谢动力学研究 [J]. *核农学报*, 2004, 18(6): 480 – 484.
- [18] Hilton L S, Bean A G, Kimpton W G, et al. Interleukin-2 directly induces activation and proliferation of chicken T cells *in vivo* [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2002, 22(7): 755 – 763.
- [19] 蔡永明, 陈拯民, 孙超渊, 等. 酶联免疫法研究注射用重组人胸腺肽 $\alpha 1$ 的猕猴药动学 [J]. *药物评价研究*, 2009, 32(2): 88 – 91.
- [20] Geferson Fischer, Carina M, Moraes, Gilberto D Vargas. Recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit humoral adjuvant effect depends on dose and administration route [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2010, 26: 489 – 495.
- [21] L Lazorova, S Jolander A, Russell-jones G J, et al. Intestinal tissue distribution and epithelial transport of the oral immunogen LTB, the B subunit of *E. coli* heat-labile enterotoxin [J]. *Journal of Drug Targeting*, 1993, 1: 331 – 340.
- [22] 胡 明, 吕灿群, 崔耀宗. 大鼠各脏器神经节苷脂分布规律的研究 [J]. *皖南医学院学报*, 1998, 17(4): 355 – 356.
- [23] 宋 艳, 李 宁, 黄 飞, 等. 狂犬病毒作为神经示踪剂的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2011(5): 71 – 74.
- [24] 陈 超, 王 建, 杨 萍, 等. 破伤风毒素 C 端片段与心肌营养素-1 融合蛋白表达、纯化与靶向神经元逆向运输及神经营养活性鉴定 [J]. *中华外科杂志*, 2009, 47(3): 202 – 205.
- [25] 陈 林. 枯否氏细胞及其与肝脏疾病的关系 [J]. *解放军医学情报*, 1994, 8(6): 306 – 308.
- [26] 金贝贝, 徐文兵. 过敏性肺炎 [J]. *国际呼吸杂志*, 2012, 32(10): 773 – 778.