

CpG-DNA 对金黄色葡萄球菌诱导的乳腺炎大鼠的保护研究

朱于敏, 苗晋锋, 邹思湘, 陈伟华

(南京农业大学农业部动物生理生化重点开放实验室, 南京 210095)

摘要: 【目的】建立金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 感染的大鼠乳腺炎模型, 并观察 CpG-DNA 对乳腺的保护作用。【方法】18 只雌鼠分 3 组 (n=6), 产后 72h 分别灌注磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) (C 组)、 2×10^5 CFU·ml⁻¹ (L 组) 和 2×10^{12} CFU·ml⁻¹ (H 组) 金葡萄菌到第四对乳腺内, 24 h 处死。L 组乳腺病变轻微, H 组腺泡结构破坏严重, 并有大量嗜中性粒细胞 (polymorphonuclear neutrophils, PMN) 浸润; H 组乳腺组织 TNF- α 、IL-6 水平显著上升。选择 2×10^{12} CFU·ml⁻¹ 为诱发剂量观察 CpG-DNA 对乳腺的保护作用: 72 只雌鼠分成对照和试验组 (n=36), 对照组产后 0 h 肌注 PBS; 试验组肌注 CpG-DNA, 72 h 后灌注金葡萄菌到第四对乳腺内。分别于灌注前 (定义为 0 h), 灌注后 8、16、24、48 和 72 h (n=6) 处死。【结果】感染初期试验组乳腺腺泡内 PMN 较对照组浸润迅速。试验组乳腺组织白细胞介素-6 (interleukine-6, IL-6) 在 16、24 和 48 h 显著高于对照组。CpG-DNA 能显著提高 0、24 和 72 h 乳腺组织肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平。试验组 8、16 和 72 h 的乳腺组织金葡萄菌数显著低于对照组。CpG-DNA 能显著提高乳腺组织中其特异性受体 TLR-9 (toll-like receptor-9) mRNA 表达水平。【结论】CpG-DNA 对金葡萄菌感染诱发大鼠乳腺炎的乳腺有保护作用。

关键词: 乳腺炎; 大鼠; 模型; 金黄色葡萄球菌

Protective Effect of CpG-DNA on Rat with Mastitis Induced by *Staphylococcus aureus* Infection

ZHU Yu-min, Miao Jin-feng, ZOU Si-xiang, CHEN Wei-hua

(Key Laboratory Animal Physiology and Biochemistry, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: 【Objective】The study aimed to establish a rat mastitis model induced by a *Staphylococcus aureus* infection and to observe the protective effect of CpG-DNA on mammary glands of rats with mastitis. 【Method】18 rats were divided into 3 groups. 2×10^5 CFU·ml⁻¹ (L group), 2×10^{12} CFU·ml⁻¹ of *S. aureus* (H group) and phosphate-buffered saline (C group) were inoculated into the mammary glands 72 h after parturition. All the rats were sacrificed at 24 h after infection. The pathological variance of mammary gland from L was mild, but the mammary gland structure from H was seriously destructed, as polymorphonuclear neutrophils (PMN) were accumulated in alveoli. TNF- α and IL-6 in mammary gland from H elevated significantly. So the 2×10^{12} CFU·ml⁻¹ was chosen to evaluate the effect of CpG-DNA on mammary gland. 72 rats were divided into control and treatment group. PBS(control) and CpG-DNA(treatment) were injected intramuscularly into rats after parturition. Then 2×10^{12} CFU·ml⁻¹ of *S. aureus* were inoculated into the fourth mammary glands 72 h after parturition. Before (defined as 0h) and after 8, 16, 24, 48 and 72 h (n=6) of inoculation, all the rats were sacrificed. 【Result】The PMN infiltrated to the mammary gland more promptly in treatment group than control at the initial stage of infection. IL-6 in mammary gland from treatment group was significant higher than the control at 16, 24 and 48 h. CpG-DNA could elicit significant elevated TNF- α in mammary gland before infection, 24 and 72 h after infection. Viable *S. aureus* counts in treatment group were significantly lower at 8, 16 and 72 h postinfection than control. CpG-DNA induced higher level of its specific receptor TLR-9 mRNA in mammary gland than control. 【Conclusion】CpG-DNA protected the mammary gland against mastitis by *S. aureus* infection in rat.

Key words: Mastitis; Rat; Model; *Staphylococcus aureus*

收稿日期: 2005-11-27; 接受日期: 2006-07-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30371049, 30671533)

作者简介: 朱于敏 (1977-), 女, 山东莱芜人, 博士研究生, 研究方向为泌乳生理生化。Tel: 025-84396763; E-mail: zym7712@yahoo.com.cn。通讯作者邹思湘 (1946-), 男, 江苏苏州人, 教授, 研究方向为泌乳生物学与乳腺健康。Tel: 025-84396763; E-mail: sixiangzou@njau.edu.cn

0 引言

【研究意义】乳腺炎是导致奶牛业损失最严重的疾病之一。金黄色葡萄球菌是最常见的急性和亚急性乳腺炎的致病菌,虽然对此病已有 100 多年的研究历史,但仍没彻底解决^[1]。【前人研究进展】小鼠乳腺炎模型在 1970 年由 Chandle^[2]最先建立,但其操作繁琐,而细菌感染的大鼠乳腺炎模型尚未见报道。Brouillette^[3]等发现金葡萄菌易长期潜存于乳腺上皮细胞和乳腺的其它细胞内,而抗生素通常不能进入细胞或细胞内浓度太低而疗效不佳。金葡萄菌疫苗对临床症状的减轻及预防作用有限^[3]。【本研究切入点】随着对乳腺免疫机制的深入了解,乳腺炎的研究重点由被动治疗转向积极预防,因此建立一种符合临床发病机制的乳腺炎动物模型并探索提高动物的乳腺免疫功能增强其抗感染能力的研究十分重要。CpG-DNA 可增强机体的免疫效应^[4],CpG-DNA 预处理对感染单核细胞增多性李氏菌^[5]、弗朗西斯氏菌^[6]等的小鼠有保护作用。但其对金葡萄菌感染的作用尚未见报道。【拟解决的关键问题】建立金葡萄菌感染的大鼠乳腺炎模型,并采用免疫调节剂 CpG-DNA,观察其对乳腺的保护作用,为乳腺炎的生物防治提供试验与理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

本试验于 2004 年 9 月~2005 年 5 月在南京农业大学农业部动物生理生化重点开放实验室进行。

1.2 试验材料

1.2.1 清洁级 SD 大鼠 135 只清洁级雌鼠 90 只,体重 250~280 g,未孕,雄鼠 45 只,体重 300~350 g。饲养 1 周后,将雌鼠与雄鼠按 2:1 同笼饲养,使之交配受孕。

1.2.2 细菌准备 金黄色葡萄球菌 26081 为乳腺炎致病菌,购自中国医学微生物菌种保藏管理中心(CMCC)。平板稀释计数法将其浓度调整为 $2 \times 10^5 \text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ 和 $2 \times 10^{12} \text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

1.2.3 CpG-DNA 由中国农业科学院朱鸿飞研究员馈赠。用灭菌 $0.01 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.2 PBS 将 CpG-DNA 调整成浓度为 $2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 。

1.2.4 大鼠 TLR-9 及 β -actin 基因引物设计与合成 TLR-9 (toll-like receptor-9) 上游引物序列: 5'-GGG CCCATTGTGATGAACA-3', 下游引物: 5'-GCTGCCA CACTTACACCAT-3', 产物为 141 bp。 β -actin 上游

引物序列: 5'-CCCTGTGCTGCTCACCGA-3' 下游引物: 5'-ACAGTGTGGGTGACCCCGTC-3', 产物为 168 bp。

1.2.5 主要试剂与仪器 异硫氰酸胍、反转录酶(M-MLV)、DNA 聚合酶(Taq)、RNA 酶抑制剂为美国 Promega 公司产品, Oligo dT18、dNTP 和琼脂糖为生物工程公司产品。IL-6 和 TNF- α 试剂盒购于解放军总医院科技开发中心放免所。FMJ-182 放射免疫 γ 计数器(中国科学院上海原子核研究所日环仪器厂), TPERSONRAL 型 PCR 仪(美国 Biometra 公司), JS-380 自动凝胶图象分析仪(上海培清科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠试验性乳腺炎模型的建立 18 只受孕雌鼠随机分为 3 组, 产后 72 h 分别用灭菌 PBS (C 组)、 $2 \times 10^5 \text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ (L 组) 和 $2 \times 10^{12} \text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ (H 组) 金葡萄菌各 100 μl /侧经乳头管灌注到第四对(双侧)乳腺内, 方法参考文献[7]。24 h 后处死大鼠收集乳腺组织。

1.3.2 CpG-DNA 对金黄色葡萄球菌诱导的大鼠实验性乳腺炎的作用研究 72 只受孕雌鼠随机分为对照和试验组(n=36), 对照组母鼠产后 0 h 于左后腿胫骨前肌内注射 PBS100 μl /只, 试验组肌注 CpG-DNA 200 μg /只。72 h 后灌注 $2 \times 10^{12} \text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ 金葡萄菌 100 μl /侧到第 4 对乳腺内(双侧)。分别于灌注前(定义为 0h), 灌注后 8、16、24、48、72 h (n=6) 将雌鼠处死, 收集乳腺组织。

1.3.3 测定指标与方法

(1) 乳腺病理组织学变化 取乳腺组织 Bouin 氏液固定, 石蜡包埋, 切片, H.E. 染色后进行观察。

(2) 乳腺细胞因子测定及乳腺组织细菌计数 取部分乳腺组织与灭菌 PBS 以 1:4 (W/V) 冰浴匀浆, 取 500 μl 匀浆液采用稀释平板计数法进行金葡萄菌计数, 剩余匀浆液 3 000 r/min, 离心 30 min, 取上清, 放射免疫分析法测定 IL-6 和 TNF- α 水平。

(3) 半定量 RT-PCR 方法测定乳腺组织 CpG-DNA 受体 TLR-9 mRNA 表达 乳腺组织总 RNA 用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法提取, 用随机引物对 RNA 进行反转录。50 μl PCR 反应体系: RT 产物 6 μl , $10 \times \text{PCR buffer}$ 5 μl , $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgCl}_2$ 4 μl , $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP 2 μl , $20 \text{pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ TLR-9 上下游引物各 1 μl , $1.5 \text{pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ β -actin 上下游引物各 1 μl , 100 U Taq 酶 0.5 μl , DEPC 水 28.5 μl 。PCR 反应条件为: 94°C 预变性

5 min; 94℃30s, 55℃30 s, 72℃45s, 29 圈循环后 72℃延伸 10 min。

取 20 μl PCR 产物于 2.5%EB 染色的琼脂糖凝胶上电泳。用 JS-380 自动凝胶图象分析仪进行图像处理及灰度分析, 根据 TLR-9 与 β-actin PCR 产物的灰度比, 确定 TLR-9mRNA 表达的相对含量。

1.4 数据统计与分析

数据用 SPSS12.0 软件统计, 差异显著性检验用独立样本 t 检验和单因子方差分析 (one-way ANOVA, LSD)。统计结果以平均数±标准误 (Mean±SE) 表示。

2 结果与分析

2.1 大鼠试验性乳腺炎模型的建立

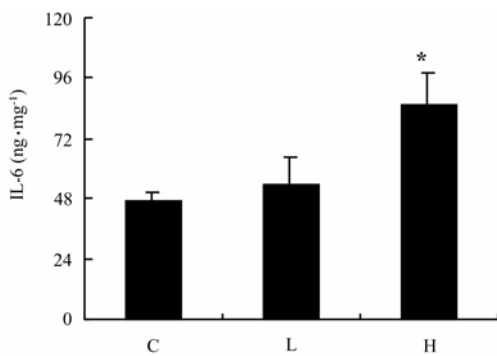
2.1.1 乳腺病理形态学观察 L 组乳腺组织病变轻微, 仅见腺泡腔内乳汁分泌减少 (图 1-L), H 组腺泡结构破坏严重, 腺泡腔内有大量嗜中性粒细胞 (polymorphonuclear neutrophils, PMN) 浸润 (图 1-H), 对照组未见病理变化 (图 1-C)。

2.1.2 乳腺组织细胞因子的变化 H 组乳腺组织 IL-6 和 TNF-α 水平较对照组有显著上升, 而 L 组无显著变化 (图 2, 3)。

C,L,H 分别为灌注 PBS (C), 2×10^5 CFU·ml⁻¹ (L) 和 2×10^{12} CFU·ml⁻¹ (H) 金葡菌后大鼠乳腺组织。C 组无病理变化; L 组仅见腺泡腔乳汁分泌量减少; H 组乳腺组织结构破坏严重, 腺泡腔内有嗜中性粒细胞浸润
C,L,H was the histological studies of mammary gland after infused with PBS(C), 2×10^5 CFU·mL⁻¹ (L) and 2×10^{12} CFU·mL⁻¹ (H) *S. aureus* respectively. No pathological changes were observed in control. Milk secretion was reduced in alveolus from L. The structure of mammary gland was destroyed seriously and PMN were infiltrated in alveolus from H group

图1 灌注PBS和不同浓度金葡菌后大鼠乳腺组织 (H.E.×600)

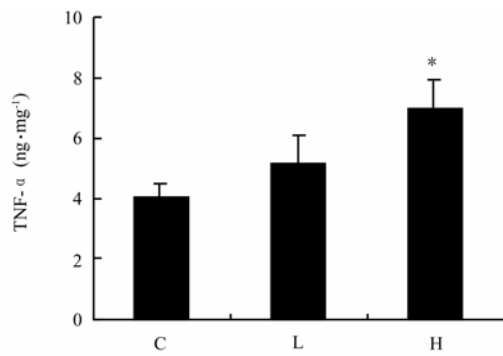
Fig. 1 Rat mammary gland after infused with PBS and different concentrations of *S. aureus* respectively (H.E.×600)



与对照组相比, *P<0.05, **P<0.01。Compared with the control group, *P<0.05, **P<0.01

图2 乳腺组织中 IL-6 水平的变化

Fig. 2 Changes of IL-6 in mammary gland



与对照组相比, *P<0.05, **P<0.01。Compared with the control group, *P<0.05, **P<0.01

图3 乳腺组织中 TNF-α 水平的变化

Fig. 3 Changes of TNF-α in mammary gland

2.2 CpG-DNA 对金黄色葡萄球菌诱导的大鼠试验性乳腺炎的作用研究

2.2.1 乳腺病理形态学观察 对照组乳腺组织在 0 h 无病变 (图 4-A), 试验组腺泡腔内可见少量炎性细胞浸润 (图 4-E)。对照组在 8 h 有少量 PMN 浸润 (图 4-B), 而试验组明显增多 (图 4-G)。16 h 后 PMN

逐渐增加 (图略), 24 h 为高峰, 并伴随乳腺组织结构严重破坏 (图 4-C, H)。48 h 后 PMN 逐渐减少 (图略), 72 h 后对照组仍有少量 PMN (图 4-D), 而试验组已无 (图 4-I)。

2.2.2 乳腺组织细胞因子的变化 乳腺组织各项指标测定结果如表。

A~D 分别为对照组灌注金黄色葡萄球菌前 (定义为 0h), 灌注后 8, 24, 72h 乳腺组织形态学观察结果。灌注前 0h 乳腺组织无病理变化, 灌注后 8h 腺泡内开始有少量 PMN 浸润, 24h 最多, 72h 仍有少量浸润。E~H 分别为实验组灌注金黄色葡萄球菌前 (定义为 0h), 灌注后 8, 24, 72h 乳腺组织形态学观察结果。灌注前 0h 腺泡内有少量 PMN 浸润, 灌注后 8h 较对照组明显增多, 24h 达高峰, 72h 已无浸润

A-D were the histological studies of control mammary gland before (defined as 0 h) and 8, 48, 72 h postinfection with *S. aureus* respectively. No pathological changes was observed in mammary gland before infection, A few PMN were infiltrated in alveolus 8 h postinfection and 24h reached the peak and a few PMN were also observed 72 h postinfection. E-H were the histological studies of mammary gland in treatment group before (defined as 0 h) and 8, 48, 72 h postinfection with *S. aureus* respectively. A few PMN was infiltrated in alveolus 0 h before infection. The PMN were significantly higher than the control at 8 h postinfection and peaked also at 24 h postinfection. No PMN were observed at 72 h postinfection

图 4 灌注金黄色葡萄球菌后乳腺组织 (H.E.×600)

Fig. 4 Rat mammary gland after infused with *S. aureus* (H.E.×600)

表 大鼠感染金黄色葡萄球菌后乳腺组织中细胞因子的变化

Table Changes of cytokines in mammary gland after infection with *S. aureus* of rat

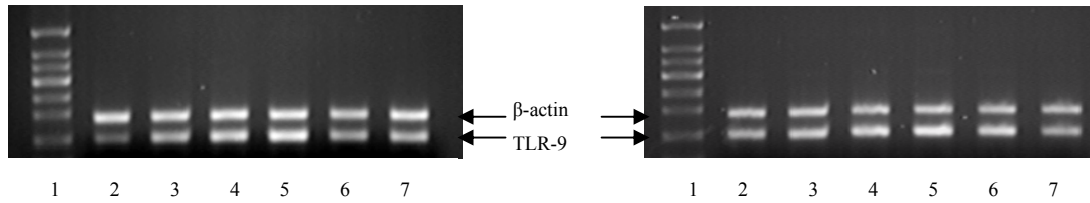
测定指标 Measurements		乳腺灌注金黄色葡萄球菌后时间 Hours after infection with <i>Staphylococcus aureus</i> of rat (h)					
		0	8	16	24	48	72
IL-6 (pg·mg ⁻¹)	对照组 Control	42.56±2.00	47.65±2.29	53.28±3.58	57.31±10.88	59.28±6.11*	55.36±3.89
	试验组 Treatment	51.00±6.01	67.63±5.59a	93.49±23.10*	97.66±4.92*a	86.73±8.82*a	69.18±8.40
TNF-α (ng·mg ⁻¹)	对照组 Control	3.20±0.15	4.00±0.42	7.73±0.71**	10.25±0.58**	5.01±0.73**	4.35±0.50
	试验组 Treatment	5.04±0.70a	5.14±0.72	9.84±1.34	18.53±2.52**b	10.95±3.01*	10.74±0.83*b
细菌数 Pacteria counts (Log10CFU·g ⁻¹)	对照组 Control	0	9.52±0.46**	10.28±0.96**	11.29±1.03**	8.01±0.75**	4.94±0.23**
	试验组 Treatment	0	7.80±0.46**b	9.28±0.59**a	10.07±1.56**	7.03±0.75**	3.26±0.15**b

横排数据与 0h 相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 纵排数据的试验组与对照组相比较, a: $P<0.05$, b: $P<0.01$

Compared with the 0h in the same line, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Treatment group compared with the control in the same column, a: $P<0.05$, b: $P<0.01$

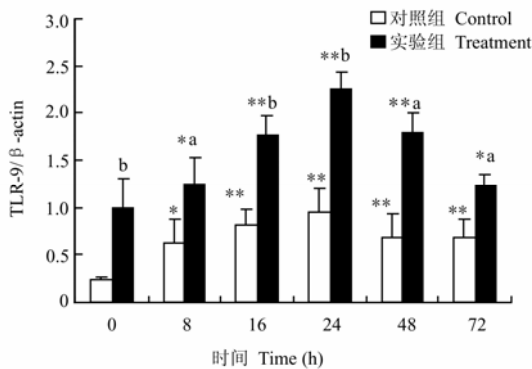
2.2.3 乳腺组织 TLR-9mRNA 表达的变化 对照组和试验组乳腺组织 TLR-9mRNA 表达较感染前均有显著升高, 并同在感染后 24 h 达最高。试验组在 0 h、

16 h 和 24 h 较对照组有极显著上升, 在感染后 8 h、48 h 和 72 h 有显著上升(图 5, 6)。



1: 分子量标记(50 bp ladder), 2~7: 分别为灌注金黄色葡萄球菌前(定义为 0 h)和灌注后 8、16、24、48、72 h
1: DNA marker(50bp ladder), 2-7: 0 h preinoculation, 8, 16, 24, 48, 72 h postinoculation of *S. aureus*

图 5 对照(左)和试验组(右)大鼠灌注金黄色葡萄球菌前后乳腺组织 TLR-9 mRNA 相对丰度的电泳
Fig. 5 Agarose gel electrophoresis photo of TLR-9 mRNA result for control (L) and treatment group (R)



灌注金黄色葡萄菌后与灌注前 0 h 相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 同一时间点试验组与对照组相比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$
Compared with the 0h in the same group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Treatment group compared with the control at the same time, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$

图 6 大鼠灌注金黄色葡萄菌前后乳腺组织 TLR-9 mRNA 表达的变化

Fig. 6 TLR-9 mRNA in mammary gland pre and postinoculation of *S. aureus*

3 讨论

小鼠的乳腺炎模型早在 1970 年由 Chandler 最先建立^[2], 但小鼠乳导管较细, 操作需要借助放大镜, 而大鼠在泌乳期乳导管较发达, 可肉眼直接操作。因此本研究选用分娩后 72 h 的大鼠为模型动物。

L 组乳腺组织的病变轻微, 而 H 组乳腺组织结构破坏严重, 腺泡腔内有大量 PMN 浸润, 与 Chew^[8]等的研究结果一致。IL-6 和 TNF- α 等是乳腺炎过程中最

重要的白细胞聚集因子^[9], 大量的 PMN 是 TNF- α 和 IL-8 的重要来源^[10]。H 组乳腺组织 TNF- α 水平显著上升, 可能是因 PMN 大量入侵引起。与 Hagiwara^[11]研究结果一致, H 组乳腺组织 IL-6 水平显著升高。L 组 TNF- α 和 IL-6 水平无显著变化。由上可知 2×10^{12} CFU·ml⁻¹ 金黄色葡萄菌成功诱导了大鼠乳腺炎, 故选用此剂量观察 CpG-DNA 对大鼠乳腺炎乳腺的保护作用。

试验组在 0 h 乳腺内可见少量炎性细胞浸润。Gomis^[12]发现注射 CpG-ODN 后第 3 天在注射部位有炎性细胞浸润。Me^[13]研究表明 IL-6、IL-8 等的水平及 PMN 向乳腺组织的迁移和浸润共同影响乳腺炎的轻重。CpG-DNA 处理后在感染前和感染后 8 h 乳腺内 PMN 快速多量的浸润为彻底清除细菌提供了保障, 与之相照应, 对照组在感染后 72 h 腺泡内仍有少量 PMN, 而试验组已无, 且试验组乳腺组织金黄色葡萄菌数在 8、16 和 72 h 显著低于对照组, 表明 CpG-DNA 明显减少了金黄色葡萄菌数, 减弱并缩短了炎症过程。

IL-6 在炎症反应时发挥多重作用, 缺乏 IL-6 的小鼠无法控制病毒、细菌的感染^[14]。Nakane^[15]发现 IL-6 在金黄色葡萄菌感染的乳腺炎过程中发挥保护作用。CpG-DNA 可以刺激巨噬细胞、树突状细胞及 B 细胞分泌 IL-6^[16,17]。对照和试验乳腺组织 IL-6 水平分别在感染后 48 h 和 24 h 上升至最高, 试验组 IL-6 在 8、24 和 48 h 较对照显著升高, 提示 CpG-DNA 通过加速 IL-6 的释放和提高 IL-6 的水平发挥保护作用。体内外研究证实 CpG-DNA 能刺激小鼠巨噬细胞分泌 TNF- α ^[17]。Nakane^[15]发现内源性 TNF- α 在抵抗金黄色葡萄菌

感染过程中发挥保护作用。试验组 TNF- α 较对照组在 0 h 和 24 h 均有显著升高,提示 CpG-DNA 可通过提高乳腺组织 TNF- α 水平发挥作用。

免疫细胞对 CpG-DNA 的识别和信号转导是通过其特异性的受体-TLR-9 实现的^[18]。TLR-9 主要表达于鼠的髓样树突细胞、单核细胞及巨噬细胞^[19],下丘脑和肝脏组织中也有组成型弱表达^[20,21],另外奶牛和山羊的空肠, Peyer 结及肠系膜淋巴结都有 TLR-9 的表达^[22],但至今尚未见其在大鼠乳腺组织表达的研究。本研究证实大鼠乳腺组织有 TLR-9mRNA 表达,且试验组 TLR-9 mRNA 水平显著高于对照组,表明 CpG-DNA 可促进大鼠乳腺组织 TLR-9mRNA 的表达,为其发挥作用提供分子学基础。TLR-9 可激活 NF- κ B 途径引起 TNF- α 和 IL-6 等细胞因子的产生和释放^[23]。与此一致,试验组乳腺组织 IL-6 和 TNF- α 显著高于对照组。

4 结 论

用 2×10^{12} CFU·ml⁻¹ 的金黄色葡萄球菌成功诱导了大鼠乳腺炎模型,且 CpG-DNA 对所感染大鼠的乳腺有保护作用,本研究为乳腺炎的生物防治提供了一条新的思路和途径。大鼠乳腺炎模型在一定程度上模拟了临床奶牛乳腺炎的发病机制,因此 CpG-DNA 对奶牛乳腺炎的作用值得进一步研究。

References

- [1] Leitner G, Lubashevsky E, Trainin Z. Staphylococcus aureus vaccine against mastitis in dairy cows, composition and evaluation of its immunogenicity in a mouse model. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2003, 93: 159-167.
- [2] Chandler R L. Experimental bacterial mastitis in the mouse. *Journal of Medical Microbiology*, 1970, (3):273-282.
- [3] Brouillette E, Grondin G, Lefebvre C, Talbot B G, Malouin F. Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Microbiology*, 2004, 101: 253-262.
- [4] 李文波, 权启镇. CpG-DNA 的免疫学活性及其作用机理研究进展. 国外医学免疫学分册, 2000, (23):302-305.
Li W B, Quan Q Z. Immunity of CpG-DNA and the proceedings of its mechanism. *Fascicule of Foreign Medical Immunology*, 2000, (23):302-305.(in Chinese)
- [5] Krieg A M, Love-Homan L, Yi Ae-Kyung, Harty J T. CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *The Journal of Immunology*, 1998, 161: 2428-2434.
- [6] Elkins K L, Rhinehart-Jones T R, Stibitz S, Conover J S, Klinman D M. Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria. *The Journal of Immunology*, 1999, 162: 2291-2298.
- [7] 钟 凯, 王艳玲, 邹思湘, 陈伟华. 乳头管灌注内毒素诱发大鼠实验性乳腺炎模型的建立. 农业生物技术学报, 2005, (13): 654-658.
Zhong K, Wang Y L, Zou S X, Chen W H. Establishment of experimental mastitis model by endotoxin via teat duct in rat. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2005, (13):654-658.(in Chinese)
- [8] Chew B P, Zamora C S, Luedecke L O. Effect of vitamin A deficiency on mammary gland development and susceptibility to mastitis through intramammary infusion with *Staphylococcus aureus* in mice. *American Journal of Veterinary Research*, 1985, 46(1): 287-293.
- [9] Winter P, Colditz L G. Immunological response of the lactating ovine udder following experimental challenge with *Staphylococcus epidermidis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2002, 89: 57-65.
- [10] Rambeaud M, Almeida R A, Pighetti G M, Oliver S P. Dynamics of leukocytes and cytokines during experimentally induced *Streptococcus uberis* mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2003, 96: 204.
- [11] Hagiwara K, Yamanaka H, Hisaeda K, Taharaguchi S, Kirisawa R, Iwai H. Concentrations of IL-6 in serum and whey samples from healthy and mastitis cows. *Veterinary Research Communications*, 2001, 25: 99-108.
- [12] Gomis S, Babiuk L, Godson D L, Allan B, Thrush T, Townsend H, Willson P, Waters E, Hecker R, Potter A. Protection of chickens against *Escherichia coli* infections by DNA containing CpG motifs. *Infection and Immunity*, 2003, 71: 857-863.
- [13] Me J K, Harp J A. Immunity in the mammary gland. *Veterinary Clinical North American Food Animal Practice*, 2001, 17: 495-516.
- [14] 李 冬. CpG-DNA 一种新型免疫佐剂. 生命的化学, 1999, 19(5):244-245.
Li D. CpG-DNA a new immunoadjuvant. *Chemistry of Life*, 1999, 19(5):244-245. (in Chinese)
- [15] Nakane A, Okamoto M, Asano M, Kohanawa M, Minagawa T. Endogenous gamma interferon, tumor necrosis factor and interleukin-6 in *Staphylococcus aureus* Infection in mice. *Infection*

- and Immunity*, 1995, 63: 1165-1172.
- [16] Schultz K R, Su W N, Hsiao C C, Pobo G, Fevon G, Bader S, MacFarlane D E, Gilman A L. Chloroquine prevention of murine MHC-disparate acute Graft-versus-Host disease correlates with inhibition of splenic response to CpG-DNA oligodeoxynucleotides and alterations in T-Cell cytokine production. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2002, (8): 648-655.
- [17] Yasuda K, Ogawa Y, Kishimoto M, Takagi T, Hashida M, Takakura Y. Plasmid DNA activates murine macrophages to induce inflammatory cytokines in a CpG-DNA motif-independent manner by complex formation with cationic liposomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 293: 344-348.
- [18] 冯涛. TLR9 的结构、功能及信号传导研究进展. 国外医学免疫学分册, 2005, (2): 74.
Feng T. Proceedings of the structure, function and signal transduction of TLR-9. *Foreign Medical Sciences Section of Immunology*, 2005, (2): 74. (in Chinese)
- [19] Lee S, Hong J, Choi S Y, Oh S B, Park K, Kim J S, Karin M, Lee S J. CpG oligodeoxynucleotides induce expression of proinflammatory cytokines and chemokines in astrocytes: the role of c-Jun N-terminal kinase in CpG ODN-mediated NF- κ B activation. *Journal of Neuroimmunology*, 2004, 153: 50-63.
- [20] Ono A, Okuma Y, Hosoi T, Nomura Y. Effect of subdiaphragmatic vagotomy on bacterial DNA-induced IL-1 β expression in the mouse hypothalamus. *Brain Research*, 2004, 1028: 233-237.
- [21] Campillo M S, Chicano A, Torio A, Martin-Orozco E, Gamiz P, Hernandez-Caselles T, Garcia-Penarrubia P. Implication of CpG-ODN and reactive oxygen species in the inhibition of intracellular growth of *Salmonella typhimurium* in hepatocytes. *Microbes and Infection*, 2004, 6: 813-820.
- [22] Menzies M, Ingham A. Identification and expression of Toll-like receptors 1-10 in selected bovine and ovine tissues. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006, 109(1-2): 23-30.
- [23] 李军. Toll 样受体-9 的研究进展. 免疫学杂志, 2004, (3): 75.
Li J. Proceedings of the Toll-like receptor-9. *Immunological Journal*, 2004, (3): 75. (in Chinese)

(责任编辑 林鉴非)