

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)06-0585-04

## 肺炎支原体 P1C-IL-2 融合基因疫苗鼻饲对小鼠免疫效果的检测

朱翠明<sup>1</sup>, 余敏君<sup>1</sup>, 高顺利<sup>2</sup>, 曾焱华<sup>1</sup>, 游晓星<sup>1</sup>, 吴移谋<sup>1\*</sup>(南华大学: <sup>1</sup>医学微生物学与免疫学教研室; <sup>2</sup>附属第一医院, 湖南 衡阳 421001)

**[摘要]** 目的 研究肺炎支原体(Mp)P1C-IL-2 融合基因疫苗经鼻饲免疫小鼠后的免疫应答水平和免疫保护作用, 了解 IL-2 对 P1C 核酸疫苗的免疫佐剂效应。方法 将构建的 P1C-IL-2 核酸疫苗鼻饲免疫 BALB/c 鼠, ELISA 检测免疫小鼠血清 IgG 滴度、IgG 亚类和支气管肺泡灌洗液中 IgA 及 IFN- $\gamma$ 、IL-4 的水平; 建立小鼠 Mp 感染模型, 观察 Mp 攻击后小鼠肺组织炎症情况和支气管肺泡灌洗液中 Mp 菌落数的变化。结果 P1C-IL-2 双基因疫苗组小鼠血清中的总 IgG、IgG1、IgG2a 亚类和支气管肺泡灌洗液中 IFN- $\gamma$  和 IL-4 水平均较 P1C 疫苗组小鼠显著增高 ( $P < 0.05$ ), 但两组支气管肺泡灌洗液 IgA 差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。用 Mp 滴鼻感染免疫小鼠, 第 1、3、6 天 P1C-IL-2 双基因融合疫苗组小鼠肺组织炎症病理评分显著高于 P1C 单基因疫苗免疫组小鼠, 两组小鼠支气管肺泡灌洗液中的 Mp 菌落数差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。结论 IL-2 能显著增强 P1C 疫苗的免疫应答水平, 但在感染早期也激发了较强的肺组织炎症。

**[关键词]** 肺炎支原体; P1 基因; 基因疫苗; IL-2

**[中图分类号]** R392.33, R392.12, R518.9 **[文献标志码]** A

## Protective immune responses induced by intranasal immunization with *Mycoplasma pneumoniae* P1C-IL-2 fusion DNA vaccine in mice

ZHU Cuiming<sup>1</sup>, YU Minjun<sup>1</sup>, GAO Shunli<sup>2</sup>, ZENG Yanhua<sup>1</sup>, YOU Xiaoxing<sup>1</sup>, WU Yimou<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Department of Microbiology and Immunology; <sup>2</sup>First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the immune responses and immune protections of a DNA vaccine constructed by fusing *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*) p1 gene carboxy terminal region (p1c gene) with interleukin-2 (IL-2) gene. **Methods** BALB/c mice were immunized by intranasal inoculation of P1C-IL-2 fusion DNA vaccine. Levels of serum IgG, IgG isotypes, BAL fluids IgA, IFN- $\gamma$  and IL-4 were detected by ELISA. We established the mouse models infected with *M. pneumoniae*, and then observed the histopathological changes in lungs and counted colonies in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) after challenged intranasally with *M. pneumoniae*. **Results** Serum total IgG, IgG1 and IgG2a isotypes, levels of IFN- $\gamma$  and IL-4 in BALF increased significantly in the group inoculated with P1C-IL-2 fusion DNA vaccine as compared with the one with P1C DNA vaccine ( $P < 0.05$ ), while there was no significant difference in BALF IgA between the two groups ( $P > 0.05$ ). The lung tissue inflammation was aggravated and the histopathologic score (HPS) of P1C-IL-2 DNA vaccine immunized mice significantly increased as compared with those in P1C DNA vaccine immunized mice at 1, 3, 6 d after challenged intranasally with *M. pneumoniae* ( $P < 0.05$ ). The P1C-IL-2 fusion DNA vaccine did not show significant difference from P1C DNA vaccine in the detectable number of *M. pneumoniae* strain in BALF ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** IL-2 can enhance the systemic immune responses of P1C DNA vaccine, but it also can develop a severe histopathological change in early days after infection of *M. pneumoniae*.

**[Key words]** *Mycoplasma pneumoniae*; p1 gene; DNA vaccine; interleukin-2

肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*, Mp) 是原发型非典型肺炎的主要病原体, 约 20% ~ 30% 的社区获得性肺炎是由于 Mp 感染所致<sup>[1]</sup>。虽然大环内

酯类等抗生素可控制 Mp 感染; 但耐药菌株的不断增多给临床治疗带来困难<sup>[2-3]</sup>; 研制具有完全保护作用的 Mp 疫苗是预防和控制 Mp 感染的关键。核酸疫

收稿日期: 2012-11-29; 接受日期: 2013-01-16

基金项目: 国家自然科学基金(81072418/H1005); 湖南省教育厅重点实验室资助项目(2012年)

作者简介: 朱翠明(1972-), 女, 湖南安化人, 博士

Tel: 13407340618; E-mail: cuiming\_zhu@yahoo.com.cn

\*Corresponding author, 吴移谋, E-mail: yimouwu@sina.com

苗具有与天然抗原相同的构象和抗原性,可诱导机体产生较强的免疫应答,是目前疫苗研究的热点。P1 蛋白是 Mp 最重要的黏附分子,能激发机体较强的免疫反应,所产生的高效价抗体能阻止 Mp 黏附于呼吸道黏膜上皮细胞,因此 p1 基因是理想的核酸疫苗候选分子<sup>[4-7]</sup>。但 p1 基因中含有 21 个“TGA”密码子,无法在哺乳动物细胞中正确表达目的蛋白,我们曾选用了 p1 基因羧基端的第 3 372~4 185 位寡核苷酸(p1c 基因)构建核酸疫苗,发现其能诱导小鼠产生一定的免疫应答水平和免疫保护作用<sup>[8-9]</sup>。为进一步提高 P1C 疫苗的免疫效果,本研究将 p1c 基因和白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)基因联合构建在同一真核细胞表达载体上,通过鼻饲途径免疫 BALB/c 小鼠,观察 IL-2 对 P1C 核酸疫苗免疫效果的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** Mp M129 株(ATCC 29342)、pcDNA3.1(+)(缩写为 pcD)、pcDNA3.1(+)/IL-2(缩写为 pIL-2)、pcDNA3.1(+)/P1C(缩写为 pP1C)由南华大学病原生物学研究所保存;Lipofectamine™2000 为 Invitrogen 公司产品;小鼠 IFN- $\gamma$  和 IL-4 定量检测试剂盒购自 R&D Systems;小鼠抗 Mp 抗体(含 P1 蛋白特异性抗体)购自 Abcam 公司;HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(H+L)购自 Santa Cruz 公司;SP4 液体和固体培养基为 Oxoid 公司产品;去内毒素质粒大量抽提试剂盒为 Qiagen 公司产品;BALB/c 鼠由武汉大学实验动物中心提供,南华大学实验动物中心饲养。

### 1.2 方法

**1.2.1 Mp 的培养** 根据文献[10]将 Mp M129 菌株转种至含 20 mL SP4 培养基的烧瓶中,37℃ 培养 5~7 d,培养基颜色由红变黄后,弃上清,加入 2 mL 新鲜的 SP4 培养基,用细胞刮收获烧瓶底部的 Mp,所收获的 Mp 浓度约  $10^8 \sim 10^9$  CFU/mL。

**1.2.2 核酸疫苗的构建** 为构建 pcDNA3.1(+)/P1C-IL-2(缩写为 pP1C-IL-2)重组质粒,在 p1c 基因序列的下游和 IL-2 基因的上游分别插入 1 个 linker 序列:GATCCCCGGTACCGAGC(编码 6 个氨基酸 Asp-Pro-Arg-Val-Pro-Ser),以本所保存的 pP1C 为模板,用 p1c-F(上游引物 5'-GGGGATCCATGACGGACTTTGTCAAACC-3',下划线部分为酶切位点)和 p1c-linker-R(下游引物 5'-GATCCCCGGGTACCGAGCC-CCATCTAACAGTTCAGC-3',粗斜体部分为 linker 序列)扩增 p1c-linker 基因;以保存的 pIL-2 质粒为模板,用 linker-IL-2-F(上游引物 5'-GCTCGGTACCCGGGGATCTACAGGATCAACTCC-3',粗斜体部分为 linker 序列)和 IL-2-R(下游引物 5'-GGAATTCCTAGTTTTCCATACTGAT-3',下划线部分为酶切位点)扩增 linker-IL-2 基因;然后以 p1c-linker 基因和 linker-IL-2 基因为模板,p1c-F 和 IL-2-R 为引物扩增 p1c-IL-2 基因。纯化的 p1c-IL-2 基因和 pcD 质粒用 BamH I 和 EcoR I 双酶切,将纯化回收的酶切产物用 T4 连接酶连接,转化 *E. coli* XL-1

Blue 感受态细胞后涂布于含 50  $\mu$ g/mL 氨苄西林的 LB 平板,37℃ 过夜培养。通过 PCR、酶切、测序鉴定阳性克隆后,提取质粒 DNA,用无菌 PBS 稀释至 1  $\mu$ g/L 备用。

**1.2.3 核酸疫苗的瞬时表达** 将 pP1C-IL-2 重组质粒用 Lipofectamine™2000 瞬时转染 HeLa 细胞,48 h 后以预冷的 PBS 洗涤细胞;加入 200  $\mu$ L Western blot 细胞裂解液,10 000 r/min 离心 5 min;收集上清,加入上样缓冲液,煮沸 5 min 后离心取上清进行 SDS-PAGE;将 PAGE 胶上的蛋白经 12 V,30 min 转至 NC 膜上。以小鼠抗 Mp 为一抗,HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗,Western blot 法鉴定 P1C-IL-2 蛋白在 HeLa 细胞中的表达。根据表达蛋白的相对分子质量( $M_r$ )进行初步鉴定,P1C 蛋白的  $M_r$  约为 40 000,IL-2 的  $M_r$  约为 26 000,P1C-IL-2 融合蛋白的  $M_r$  约为 66 000。

**1.2.4 免疫接种** 将 125 只 4~6 周龄 BALB/c 雌性小鼠随机分为 5 组,即 pP1C-IL-2、pP1C、pIL-2、pcD 和 PBS 组,每组免疫 25 只小鼠;小鼠吸入乙醚轻度麻醉诱导过度通气,在每只小鼠处于吸气相时向其鼻孔内滴入 50  $\mu$ g 质粒 DNA。于第 0,14 和 28 d 进行 3 次免疫。

**1.2.5 抗感染实验** 小鼠末次免疫后 28 d,乙醚麻醉小鼠后,用加样器吸取 50  $\mu$ L 含有  $2 \times 10^7$  CFU 的 Mp 菌液缓慢滴入小鼠鼻腔使其进入气管支气管,检测疫苗免疫小鼠后的抗 Mp 感染作用。正常对照组以等量的 SP4 培养基滴鼻接种。

**1.2.6 样本的收集** 小鼠末次免疫后 28 d 和 Mp 攻击后第 1、3、6、9、12 天,摘取眼球放血处死小鼠,收集血清和支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF),将其冻存于 -80℃ 备用。肺组织用 100 mL/L 甲醛固定,石蜡包埋,切片后用苏木素和伊红(HE)染色,进行炎症病理评分。

**1.2.7 ELISA 检测融合重组蛋白** rP1C 的制备见文献[6]。将 1  $\mu$ g 纯化的 rP1C 于 4℃ 包被酶标板过夜,次日用含 0.5 mL/L Tween 20 的 PBS 洗涤酶标板 3 次,以除去未吸附的蛋白,然后用 3 g/L 的 BSA 室温封闭 2 h。各组小鼠血清 1:50 稀释、BALF 1:4 稀释后加入酶标板,37℃ 孵育 1 h, PBST 洗涤 4 次;加入 1:1 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG、IgG1、IgG2a、IgA 孵育 30 min,洗涤 4 次后向各反应孔中加入显色剂 TMB 与  $H_2O_2$  各 50  $\mu$ L,37℃ 避光孵育 10 min 后每孔加入 50  $\mu$ L 2 mol/L 硫酸终止反应。酶标仪读取 450( $A_{450}$ )值。根据试剂盒说明书定量检测小鼠血清和 BALF 中 IFN- $\gamma$ 、IL-4 的水平,两种细胞因子试剂盒的最低检测量为 4 pg/mL。

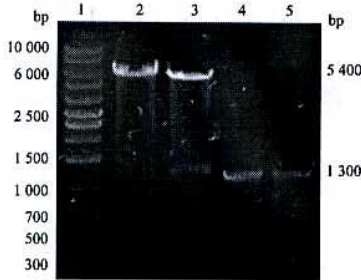
**1.2.8 Mp 菌落计数** 将 25  $\mu$ L 系列倍比稀释的 BALF 接种至 SP4 固体培养基,37℃ 50 mL/L  $CO_2$  气体条件下,培养 5~7 d,低倍镜下计数 Mp 菌落数,以 lg CFU/mL 来表示,最低菌落检出率为 40 CFU/mL。

**1.2.9 肺组织病理评分** Mp 感染小鼠后,用双盲法请组织病理学者根据文献用肺组织病理学评分系统来评价 BALB/c 鼠肺组织炎症<sup>[11]</sup>。肺组织炎症评分系统由一个 0~26 分范围的评分组成。

**1.2.10 统计学分析** 运用 SPSS16.0 软件,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,均数之间的比较采用单因素 ANOVA 分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

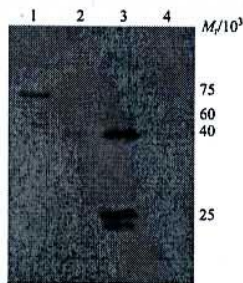
**2.1 真核重组质粒鉴定结果** pP1C-IL-2 重组质粒用 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切后用琼脂糖凝胶电泳分析,可见 5 400 bp 和 1 300 bp 的 2 个条带,其大小与线性化的 pCD 和 *p1c-IL-2* 基因片段相符。以 pP1C-IL-2 为模板,进行 PCR 扩增,其扩增片段与以 *p1c-linker* 基因和 *linker-IL-2* 基因为模板扩增的基因片段相同,表明获得阳性重组体(图 1)。



1: DNA marker; 2: *Bam*H I 和 *Eco*R I 对 pCD 双酶切结果; 3: *Bam*H I 和 *Eco*R I 对重组质粒 pP1C-IL-2 双酶切结果; 4: 以重组质粒 pP1C-IL-2 为模板扩增的 *p1c-IL-2* 基因条带; 5: 以 *p1c-linker* 和 *linker-IL-2* 基因为模板扩增的 *p1c* 基因条带。

图 1 酶切和 PCR 鉴定 pP1C-IL-2

**2.2 重组蛋白的表达** 将重组质粒转染 HeLa 细胞,Western blot 法检测结果表明, pP1C-IL-2 重组质粒能在 HeLa 细胞中表达  $M_r$  约为 66 000 的蛋白(图 2)。

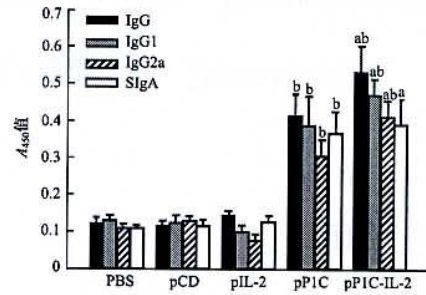


1: 转染了 pP1C-IL-2 的 HeLa 细胞裂解液; 2: 转染了 pP1C 的 HeLa 细胞裂解液; 3: EasySee Western marker; 4: HeLa 细胞裂解液。

图 2 P1C-IL-2 蛋白在转染细胞中表达的 Western blot 法鉴定

**2.3 P1C 特异性抗体和抗体亚类** P1C-IL-2 核酸疫苗第 3 次免疫后 28 d 所产生血清总 IgG 及其亚类 IgG1、IgG2a 均较对照组显著增高。对照组均未检测出明显的 P1C 特异性抗体(图 3)。各接种组 BLAF 中分泌型 IgA (secretory IgA, sIgA) 检测结果见图 3。鼻饲 P1C-IL-2 双基因疫苗组小鼠与 P1C 单基因疫苗组小鼠黏膜 sIgA 均显著高于 PBS、pCD 和 pIL-2 组 ( $P < 0.05$ ), 但双基因融合疫苗组小鼠与单基因疫

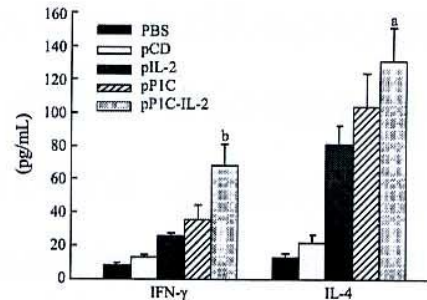
苗免疫组小鼠 sIgA 水平差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。



\* $P < 0.05$  vs pP1C; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs PBS、pCD、pIL-2。

图 3 血清 IgG 及亚类和支气管灌洗液 IgA 检测 ( $n = 5$ )

**2.4 IFN- $\gamma$  和 IL-4 水平** P1C-IL-2 核酸疫苗组小鼠支气管灌洗液中 IFN- $\gamma$  和 IL-4 水平均较 P1C 核酸疫苗免疫组小鼠显著增高 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ , 图 4)。



\* $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs pP1C。

图 4 各免疫组小鼠支气管灌洗液中 IFN- $\gamma$  和 IL-4 水平 ( $n = 5$ )

**2.5 肺组织病理改变和评分** *Mp* 攻击后第 1、3、6、9 天, P1C 疫苗组和 P1C-IL-2 核酸疫苗组小鼠的肺间质炎症明显减轻, 病变区域较局限, 肺泡间隔轻度增宽, 内有少许淋巴细胞、浆细胞浸润, 细支气管上皮排列尚规则, 腔内仅少许淋巴细胞、浆细胞浸润(图 5)。肺组织炎症的组织病理评分 (histopathologic score, HPS) 明显低于对照组, 但第 1、3、6 天 P1C-IL-2 核酸疫苗组小鼠的 HPS 值显著高于 P1C 单基因疫苗组小鼠, 第 9 天开始两组的 HPS 差异无显著性。用 SP4 培养基做对照攻击的小鼠 HPS 为 0 ~ 1 分(图 6)。

**2.6 *Mp* 攻击后各免疫组小鼠 *Mp* 菌落计数** 用 *Mp* 经呼吸道感染免疫小鼠, 1、3、6、9、12 d 后, 培养 BALF 中的 *Mp*, 计算菌落数。结果显示, P1C-IL-2 融合疫苗组的 *Mp* 菌落数较 P1C 核酸疫苗组减少, 但两组差异无显著性(表 1)。

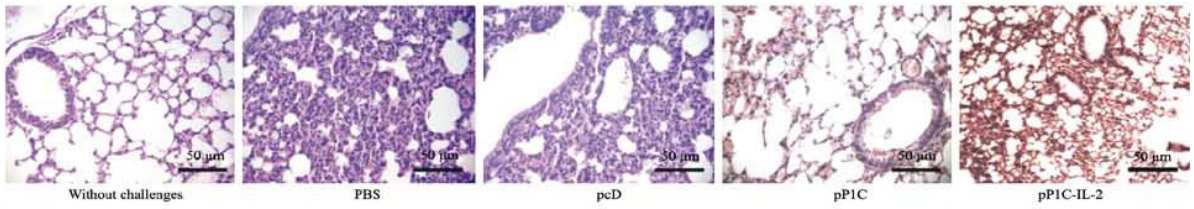
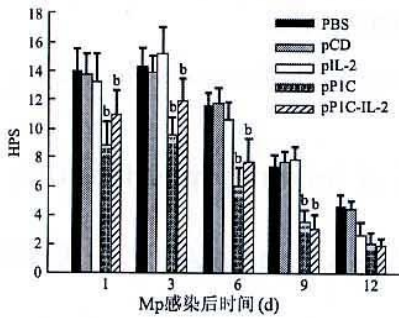


图5 Mp 感染后第3天各组肺组织代表性的病理改变



<sup>b</sup>*P* < 0.01 vs PBS, pCD, pIL-2.

图6 Mp 感染后各组肺组织病理评分

表1 Mp 攻击后各免疫组小鼠菌落计数 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

攻击后	log( <i>M. pneumoniae</i> CFU/mL)				
	PBS	pcD	pIL-2	pPIC	pPIC-IL-2
1	6.01 ± 0.65	5.97 ± 0.51	5.67 ± 0.75	4.97 ± 0.53	4.50 ± 0.81
3	5.91 ± 0.66	5.97 ± 0.54	5.59 ± 0.71	3.94 ± 0.61*	3.39 ± 0.73*
6	4.81 ± 0.80	4.80 ± 0.61	4.70 ± 0.58	3.01 ± 0.77a	2.16 ± 0.84*
9	3.83 ± 0.72	3.72 ± 0.69	3.69 ± 0.70	2.21 ± 0.56*	1.67 ± 0.68*
12	3.33 ± 0.53	3.06 ± 0.92	3.05 ± 0.66	1.70 ± 0.57*	<1.50*

\**P* < 0.05 vs 对照组 (pIL-2, pcD 或 PBS).

### 3 讨论

Mp 是一种胞外寄生菌, 其免疫主要是体液免疫。分泌型 IgA (secretory IgA, sIgA) 可阻止 Mp 对呼吸道黏膜上皮细胞的黏附, 在 Mp 感染早期发挥作用; IgG 等抗体可中和 Mp, 并阻止其向肺泡扩散, 在抗 Mp 感染中后期起主要效应<sup>[12]</sup>。目前越来越多的研究表明 Mp 也可侵入宿主的组织细胞, 在细胞内增殖, 引起持续性感染<sup>[13-14]</sup>, 细胞免疫, 尤其是 Th1 型细胞免疫对清除持续感染的 Mp 至关重要。理想的 Mp 疫苗, 应可同时增强特异性体液和细胞免疫应答水平, 发挥有效的免疫保护作用。

IL-2 是目前研究较多的细胞因子佐剂之一<sup>[15-16]</sup>, 可促进 T、B 细胞的增殖、分化, 增强体液免疫和细胞免疫应答水平。本研究在之前构建的 PIC 核酸疫苗基础上, 通过 linker 将其与 IL-2 基因连接在同一载体上, 构建了 PIC-IL-2 融合基因疫苗。为了分析 IL-2 对 PIC 疫苗的免疫增强作用, 实验检测了 PIC-IL-2 双基因疫苗鼻饲免疫小鼠后血清和支

气管肺泡灌洗液中抗体滴度及细胞因子水平, 发现双基因疫苗组小鼠血清总 IgG、IgG1 亚类和支气管肺泡灌洗液中 IL-4 水平均较 PIC 疫苗组小鼠显著增高, 但两组支气管肺泡灌洗液 IgA 差异无显著性。这表明 IL-2 能显著增强系统体液免疫水平, 但不能促进黏膜局部 IgA 的分泌。IFN- $\gamma$  是一类 Th1 型的细胞因子, 也是抗 Mp 感染最重要的一种细胞因子, 呼吸道局部 IFN- $\gamma$  的缺失可导致 Mp 的数量增高、肺组织炎症加重<sup>[17]</sup>; IgG2a 是 Th1 细胞辅助 B 细胞活化、分化成浆细胞分泌的抗体亚类。IFN- $\gamma$  和 IgG2a 的水平可在一定程度上反应细胞免疫应答水平。实验发现 PIC-IL-2 双基因疫苗组小鼠支气管灌洗液中 IFN- $\gamma$  和血清中 IgG2a 的水平显著增高, 表明 IL-2 能增强 PIC 疫苗诱导的细胞免疫。

为了解 IL-2 能否增强 PIC 疫苗的免疫保护作用, 实验用 Mp 感染疫苗接种小鼠, 在感染第 1-6 天, PIC-IL-2 双基因融合疫苗免疫组小鼠肺间质炎症显著加重, 这可能是由于 PIC-IL-2 双基因融合疫苗激发了过强的免疫应答而引发超敏反应性炎症所致<sup>[18]</sup>, 这种早期超敏反应性炎症可能与 IL-4 的过高表达有关<sup>[17]</sup>。感染 9 d 后, 肺组织炎症反应减轻, 这可能与疫苗的免疫保护作用有关。病原学检测结果发现, PIC-IL-2 双基因疫苗免疫组小鼠支气管灌洗液中 Mp 菌落数较 PIC 疫苗免疫组减少, 表明 IL-2 能增强 PIC 疫苗的免疫保护作用。

总之, 实验表明 IL-2 即可显著增强 PIC 核酸疫苗的免疫应答水平和免疫保护作用, 也可在感染早期引起较重的肺组织炎症病理反应。在以后的研究中, 将通过减少疫苗的接种量或改变疫苗的接种策略等进一步提高疫苗的有效性。

### 参考文献:

- [1] Tao LL, Hu BJ, He LX, et al. Etiology and antimicrobial resistance of community-acquired pneumonia in adult patients in China [J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(17): 2967-2972.
- [2] Bébéar C, Pereyre S, Peuchant O. *Mycoplasma pneumoniae*: susceptibility and resistance to antibiotics [J]. Future Microbiol, 2011, 6(4): 423-431.

(下转 592 页)

皮细胞在肿瘤发生过程中的生物学功能被认为是肿瘤治疗的新策略。因此用 microRNA 对其进行靶向治疗被认为具有良好的应用前景<sup>[15]</sup>。

本研究构建的过表达 miR-203 的慢病毒载体, 感染人脐静脉内皮细胞系, 筛选出稳定高表达 miR-203 的细胞株, 利用 MTT 和划痕实验证实 microRNA 能抑制 HUVEC-12 增殖和迁移。为进一步探讨 miR-203 在肿瘤血管生成中的机制提供了实验基础。

#### 参考文献:

- [1] Shrutti K, Shrey K, Vibha R. Micro RNAs; tiny sequences with enormous potential[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 407(3): 445-449.
- [2] Chitwood DH, Timmermans MC. Small RNAs are on the move [J]. Nature, 2010, 467(7314): 415-419.
- [3] Ribatti D, Ranieri G, Basile A, et al. Tumor endothelial markers as a target in cancer[J]. Expert Opin Ther Targets, 2012, 16(12): 1215-1225.
- [4] Fabbri M, Paone A, Calore F, et al. A new role for microRNAs, as ligands of Toll-like receptors[J]. RNA Biol, 2013, 10(2): 596-612.
- [5] Kanemaru H, Fukushima S, Yamashita J, et al. The circulating microRNA-221 level in patients with malignant melanoma as a new tumor marker[J]. J Dermatol Sci, 2011, 61(3): 187-193.
- [6] Shen J, Todd NW, Zhang H, et al. Plasma microRNAs as potential biomarkers for non-small-cell lung cancer[J]. Lab Invest, 2011, 91

(4): 579-587.

- [7] Abella V, Valladares M, Rodriguez T, et al. miR-203 regulates cell proliferation through its influence on haki expression[J/OA]. PLoS One, 2012, 7(12): e52568.
- [8] Viticchiè G, Lena AM, Cianfarani F, et al. MicroRNA-203 contributes to skin re-epithelialization[J/OA]. Cell Death Dis, 2012, 3: e435.
- [9] Takeshita N, Mori M, Kano M, et al. miR-203 inhibits the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma by regulating LASP1[J]. Int J Oncol, 2012, 41(5): 1653-1661.
- [10] Bian K, Fan J, Zhang X, et al. MicroRNA-203 leads to G1 phase cell cycle arrest in laryngeal carcinoma cells by directly targeting survivin[J]. FEBS Lett, 2012, 586(6): 804-809.
- [11] Markham T, Mathews C, Rogers S, et al. Downregulation of the inhibitor of apoptosis protein survivin in keratinocytes and endothelial cells in psoriasis skin following infliximab therapy[J]. Br J Dermatol, 2006, 155(6): 1191-1196.
- [12] Primo MN, Bak RO, Schibler B, et al. Regulation of pro-inflammatory cytokines TNF $\alpha$  and IL24 by microRNA-203 in primary keratinocytes[J]. Cytokine, 2012, 60(3): 741-748.
- [13] Moffatt CE, Lamont RJ. Porphyromonas gingivalis induction of microRNA-203 expression controls suppressor of cytokine signaling 3 in gingival epithelial cells[J]. Infect Immun, 2011, 79(7): 2632-2637.
- [14] Harjes U, Bensaad K, Harris AL. Endothelial cell metabolism and implications for cancer therapy [J]. Br J Cancer, 2012, 107(8): 1207-1212.
- [15] Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target[J]. Nature, 2005, 438(7070): 967-974.

#### (上接 588 页)

- [3] Morozumi M, Takahashi T, Ubukata K. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*: characteristics of isolates and clinical aspects of community-acquired pneumonia[J]. J Infect Chemother, 2010, 16(2): 78-86.
- [4] Beghetto E, De Paolis F, Montagnani F, et al. Discovery of new *Mycoplasma pneumoniae* antigens by use of a whole-genome lambda display library[J]. Microbes Infect, 2009, 11(1): 66-73.
- [5] Jacobs E, Gerstenecker B, Mader B, et al. Binding sites of attachment inhibiting monoclonal antibodies of the *Mycoplasma pneumoniae* adhesion[J]. Infect Immun, 1989, 57(3): 685-688.
- [6] 朱翠明, 汪世平, 吴移谋, 等. 肺炎支原体 P1 蛋白片段免疫学活性及黏附功能的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2012, 32(8): 706-710.
- [7] Schurwanz N, Jacobs E, Dumke R. Strategy to create chimeric proteins derived from functional adhesin regions of *Mycoplasma pneumoniae* for vaccine development[J]. Infect Immun, 2009, 77(11): 5007-5015.
- [8] Zhu C, Wu Y, Chen S, et al. Protective immune responses in mice induced by intramuscular and intranasal immunization with an *Mycoplasma pneumoniae* PIC DNA vaccine[J]. Can J Microbiol, 2012, 58(5): 644-652.
- [9] Zhu C, Wang S, Hu S, et al. Protective efficacy of a *Mycoplasma pneumoniae* PIC DNA vaccine fused with the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin[J]. Can J Microbiol, 2012, 58(6): 802-810.
- [10] Wenzel RP, Craven RB, Davies JA, et al. Field trial of an inactivated *Mycoplasma pneumoniae* vaccine. I. vaccine efficacy[J]. J Infect Dis,

1976, 134(6): 571-576.

- [11] Cimolai N, Taylor GP, Mah D, et al. Definition and application of a histopathological scoring scheme for an animal model of acute *Mycoplasma pneumoniae* pulmonary infection[J]. Microbiol Immunol, 1992, 36(5): 465-478.
- [12] Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen[J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17(4): 697-728.
- [13] Jones HP, Simecka JW. T lymphocyte responses are critical determinants in the pathogenesis and resistance to *Mycoplasma* respiratory disease[J/OA]. Front Biosci, 2003, 8: d930-d945.
- [14] Dobbs NA, Odeh AN, Sun X, et al. The multifaceted role of T cell-mediated immunity in pathogenesis and resistance to *Mycoplasma* respiratory disease[J]. Curr Trends Immunol, 2009, 10: 1-19.
- [15] Zhao F, Wu Y, Zhang X, et al. Enhanced immune response and protective efficacy of a *Treponema pallidum* Tp92 DNA vaccine vectored by chitosan nanoparticles and adjuvanted with IL-2[J]. Hum Vaccin, 2011, 7(10): 1083-1089.
- [16] Tian DY, Sun Y, Wai SF, et al. Enhancement of the immunogenicity of an alphavirus replicon-based DNA vaccine against classical swine fever by electroporation and coinjection with a plasmid expressing porcine interleukin 2[J]. Vaccine, 2012, 30(24): 3587-3594.
- [17] Woolard MD, Hodge LM, Jones HP, et al. The upper and lower respiratory tracts differ in their requirement of IFN-gamma and IL-4 in controlling respiratory *Mycoplasma* infection and disease[J]. J Immunol, 2004, 172(11): 6875-6883.
- [18] Linchevski I, Klement E, Nir-Paz R. *Mycoplasma pneumoniae* vaccine protective efficacy and adverse reactions-systematic review and meta-analysis[J]. Vaccine, 2009, 27(18): 2437-2446.