

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.23.001

转基因番茄可食防龋疫苗免疫大鼠的实验研究*

顾 瑜^{1,2}, 刘建国^{1,2△}, 白国辉^{1,2}, 吴家媛^{1,2}, 管晓燕^{1,2}, 陈 筑^{1,3}, 白朋元^{1,2}, 赵 靖^{1,4}

(1. 遵义医学院口腔学院, 贵州遵义 563000; 2. 贵州省高等学校口腔疾病研究特色

重点实验室, 贵州遵义 563000; 3. 贵阳市口腔医院口腔内科, 贵阳 550002;

4. 辽河油田总医院口腔科, 辽宁盘锦 124000)

[摘要] 目的 用表达变异链球菌表面蛋白 PAcP 和霍乱毒素 B 亚单位融合蛋白的转基因番茄免疫 SD 大鼠, 检测其免疫原性, 探索研制安全、有效的可食用防龋疫苗的可能性。方法 选择雌性 SD 大鼠 18 只, 建立龋齿模型, 随机分成 3 组 ($n=6$), 分别为转基因番茄组(实验组)、变异链球菌灭活全菌免疫组(阳性对照组)、非转基因番茄组(阴性对照组), 免疫方式为灌胃免疫, 每周免疫 1 次, 连续免疫 4 周。分别于首次免疫前 1 d 和每次免疫 1 周后采集血液、唾液样品, 用酶联免疫吸附实验法检测血清中免疫球蛋白 G(IgG)、唾液中分泌型免疫球蛋白 A(SIgA) 抗体水平; 鼠龄 70 d 时处死动物, 并取上下颌骨进行龋齿计分。结果 免疫后, 实验组和阳性对照组大鼠血清中 IgG、唾液中 SIgA 抗体水平与阴性对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$); 实验组和阴性对照组在 Dx 级外的各级差异有统计学意义 ($P<0.05$)。结论 转基因番茄防龋疫苗具有免疫原性, 能够诱导实验动物产生有效的免疫应答, 降低龋齿的发生。

[关键词] 番茄; 植物, 基因修饰; 免疫疗法; 龋齿**[中图分类号]** R392.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)23-3169-03

The study of oral immunization with the transgenic tomato anti-caries vaccine in SD rats*

Gu Yu^{1,2}, Liu Jianguo^{1,2△}, Bai Guohui^{1,2}, Wu Jiayuan^{1,2},Guan Xiaoyan^{1,2}, Chen Zhu^{1,3}, Bai Pengyuan^{1,2}, Zhao Jing^{1,4}

(1. the School of Stomatology, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China; 2. the Special Key Laboratory of

Oral Diseases Research, Higher Education Institution of Guizhou Province, Zunyi, Guizhou 563000, China;

3. Department of Stomatology, the Stomatological Hospital of Guiyang City, Guiyang, Guizhou 550002, China;

4. Department of Stomatology, Liaohe Oilfield General Hospital, Panjing, Liaoning 124000, China)

[Abstract] **Objective** SD rats were immunized with the transgenic tomatoes which carried fused gene of a region of PAc Strep-tococcus mutants and cholera toxin B subunit. The immunogenicity was tested to explore secure and economic edible vaccines against dental caries. **Methods** A total of 18 eighteen-day-old female SD rats were subdivided randomly into three groups: the experimental group which were fed with transgenic tomato juice containing chimaera protein PAcP/CTB; the positive control group which were treated with deactivated S. mutans; the negative control group which were not treated with transgenic tomato juice. Rats were immunized once per week for four weeks. Blood and saliva were collected at one day before the first immunity and one week after each immunization. IgG of blood serum and SIgA of saliva were detected using the enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) testing. On day 70, rats were terminated. The maxillary and mandibular bones were subsequently taken out to count dental caries/scores. **Results** Post immunization, the experimental group and the positive control group had statistical significant levels of specificity IgG in serum and SIgA in saliva compared to the negative control group ($P<0.05$). There was a significance difference between the experimental group and the negative control group except in Dx levels of caries loss ($P<0.05$). **Conclusion** The targeted protein expressed on the transgenic tomatoes is immunogenic, which can effectively induce mucous membrane immune response and the systematical immunoreaction to suppress the occurrence of the dental caries.

[Key words] lycopersicon esculentum; plants, genetically modified; immunotherapy; dental caries

龋病是人类最常见的细菌感染性疾病之一。就病因而言, 细菌是龋病发病的主要因素, 变异链球菌 (*S. mutans*) 表面蛋白 PAc 是被认为重要的毒力因子。PAc 的 P 区是脯氨酸富集区, P 区多肽片段中含有 B 细胞表位, 具有免疫原性和免疫反

应性^[1]。防龋疫苗经历了包括细菌活载体疫苗^[2]、亚单位疫苗^[3]、合成肽疫苗^[4]、DNA 疫苗^[5-6]等阶段。转基因植物疫苗可以通过直接口服给药, 显示出广阔的应用前景。本课题组前期获得含编码 *S. mutans* 表面蛋白 PAcP 和霍乱毒素 B 亚单位

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30160086); 贵州省第 6 批科技创新团队资助项目[黔科合人才团队(2013)4026 号]; 贵州省高等学校重点学科建设项目(SZXK-201207-04)。作者简介: 顾瑜(1980—), 副教授, 硕士, 主要从事龋病的病因及预防研究。现工作单位为遵义医学院珠海校区。△ 通讯作者, E-mail: 13087891001@163.com。

融合基因的转基因番茄^[7],并对本研究所用的番茄进行了鉴定^[8]。本研究利用该转基因番茄免疫 SD 大鼠,检测其免疫原性,探索研制安全、经济的可食用防龋疫苗的可行性。

1 材料与方 法

1.1 材料 SD 大鼠[雌鼠,许可证:SCXK-(军)2002007];变异链球菌 UA159(血清 C 型,四川大学华西口腔医学院口腔疾病研究国家重点实验室提供);辣根过氧化物酶标记的羊抗大鼠免疫球蛋白 G(IgG, Amresco 公司,美国),辣根过氧化物酶标记的羊抗大鼠 IgA(Genetex 公司,美国),S. mutans 表面蛋白抗原 PAc(武汉大学口腔医学院樊明文教授馈赠),酶联免疫检测仪(Instruments. Inc, 型号 ELx800, 美国);体视显微镜(Leica, 瑞士)。

1.2 方 法

1.2.1 植物疫苗的准备 取本课题组前期获得的表达含编码 S. mutans 表面蛋白 PAcP 和霍乱毒素 B 亚单位融合基因的转基因番茄果肉 1 g,加液氮研磨后,加入植物蛋白提取液并混匀,0℃放置 4 h;离心,将上清液置 100℃内煮沸 5 min。用蛋白质定量试剂盒(BCA 法)测定出总蛋白的浓度为 3.93 mg/mL。配制目的蛋白梯度标准液,用酶联免疫吸附实验(ELISA)法测定目的蛋白浓度,测得线性方程为 $Y=0.0092X+0.0946$ 。转基因番茄的蛋白提取样本光密度(OD)值为 0.1597,其对应浓度为 7.08 μg/mL;根据浓度计算出外源目的蛋白在总蛋白所占的比例为 0.18%。

1.2.2 灭活全菌体疫苗的制备 复苏 S. mutans,TPY 固体培养基中厌氧培养 18 h,镜下形态学鉴定。挑取典型单菌落,置于 TPY 液体培养基中,在微需氧环境下大体积培养 48 h 后,以 6 000×g 离心 10 min,弃上清液,生理盐水洗涤沉淀,加入 0.5% 福尔马林生理盐水液(v/v),37℃下放置 24 h 灭活。生理盐水洗涤,加入 0.1% 福尔马林生理盐水液,比浊,调整 $OD_{600}=1.0$,使菌液浓度达 8×10^8 CFU/mL,4℃保存。

1.2.3 动物模型建立分组及免疫 18 d 鼠龄的 SD 大鼠,雌性,断乳后饲以致龋饲料 2 000 #^[9](蔗糖 56%、精练奶粉 28%、全麦粉 6%、酵母 4%、精练豆粉 4%、食用盐 2%)。鼠龄 20 d 时,致龋饲料中加入氯霉素、氨基青霉素及羧苄青霉素,药量为 1 g/kg,连续喂养 3 d,并采集幼鼠口腔标本,观察抗菌药物灭菌情况。鼠龄 24~26 d 时,将细菌浓度为 1×10^9 CFU/mL S. mutans 菌液接种于牙面上,每天 3 次,200 μL/次,间隔 30 min。鼠龄 30 d 时采集大鼠口腔及磨牙咬合面的细菌标本,检测口腔 S. mutans 感染情况。

模型建立后,将实验动物编号 1~18,采用抽签法随机分组,将大鼠分为 3 组(每组 6 只),分别为:转基因番茄组(实验组)、变异链球菌灭活全菌免疫组(阳性对照组)、非转基因番茄组(阴性对照组)。每组分别使用相对应的疫苗,按每 10 g 体质量予以 0.4 mL 的剂量,通过灌胃的方式进行免疫。鼠龄 28 d 开始免疫,采取灌胃免疫的方式,连续免疫 4 次,每次间隔 1 周。

1.2.4 样本采集 分别于首次免疫前 1 d 和每次免疫 1 周后取血清和唾液样本。鼠龄 70 d 时,断头,分离上下颌骨。

1.2.4.1 血清及唾液中 IgG、分泌型免疫球蛋白 A(SIgA)抗体水平检测 酶标板中每孔加入 10 μg/mL 重组 PAc 蛋白缓

冲液,4℃包被过夜;次日,弃液,磷酸盐缓冲液(PBS)洗板;每孔加入 3% 牛血清清蛋白(BSA) 50 μL,置于 37℃湿盒中温育 2 h,弃液,加入血清(1:40)或唾液(1:4)标本于反应孔中,每孔 100 μL,湿盒温育 2 h,弃液,洗板。将按照 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗大鼠 IgG 或按照 1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗大鼠 IgA 加到反应孔中,每孔 100 μL,温育 2 h,弃液,洗板。各反应孔中加入 100 μL 四甲基联苯胺底物使用液,蔽光显色后,加入终止液终止反应,测定各反应孔的 OD_{450} 值。

1.2.4.2 窝沟龋齿计分 70 d 时,处死动物,取上下颌骨。0.4% 紫脲酸铵染液浸泡染色 12 h 后清洗掉多余染料,清洗,干燥。用金刚砂片沿牙体矢状面作近远中向半切。体视显微镜下观察患龋情况,龋坏部位呈现粉红色,而正常部位几乎不着色或着色很浅。根据 Keyes 经典评分按照龋坏的深度分为 4 级:龋坏仅发生于釉质层为 E 级;龋坏达到牙本质外层 1/4 为 Ds 级;龋坏达到牙本质厚度的 1/4 至 3/4 为 Dm 级;龋损累及牙本质厚度的 3/4,甚至累及牙本质全层为 Dx 级。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件统计分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间比较采用单因素方差分析,两组之间比较若方差齐用 LSD 检验,若不齐用 Tamhane 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 唾液中 SIgA 型抗体水平的观察 特异性 SIgA 抗体水平在免疫前和免疫后第 1、2 周各组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$);从免疫后第 3 周开始,阳性对照组 SIgA 抗体水平明显升高,实验组次之。阴性对照组分别与阳性对照组和实验组之间比较差异均有统计学意义($P<0.05$),但阳性对照组和实验组相比,两组差异无统计学意义($P>0.05$);免疫后第 4 周,各组的抗体水平进一步升高,3 组间两两相比差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 血液中 IgG 型抗体水平 在首次免疫后,阳性对照组抗体水平较另两组率先升高,但 3 组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$);从第 2 次免疫结束后,阳性对照组的 IgG 水平较其余两组升高明显($P<0.05$),实验组的 IgG 水平虽也有升高,但与阴性对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);首次免疫后第 3、4 周时,实验组和阳性对照组的 IgG 水平较阴性对照组均明显升高($P<0.05$),阳性对照组升高更为明显,但实验组与阳性对照组在各时间点相比差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 SD 大鼠窝沟龋 keyes 计分($\bar{x} \pm s$,分)

组别	n	keyes 评分等级			
		E	Ds	Dm	Dx
阳性对照组	6	2.667±1.435	0.917±0.792	0.167±0.389	0
实验组	6	3.833±1.946	1.583±1.165	0.667±0.985	0.167±0.387
阴性对照组	6	6.000±1.706 ^{ab}	3.833±1.801 ^{ab}	1.667±1.303 ^{ab}	0.667±0.779 ^a

^a: $P<0.05$,与阳性对照组比较;^b: $P<0.05$ 与实验组比较。

2.3 SD 大鼠窝沟龋 keyes 计分 在龋损各级的表现中阳性对照组和阴性对照组相比差异均有统计学意义($P<0.05$),实验组和阳性对照组比较差异无意义($P>0.05$),而实验组与阴

性对照组只在 Dx 级差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1、

图 1。

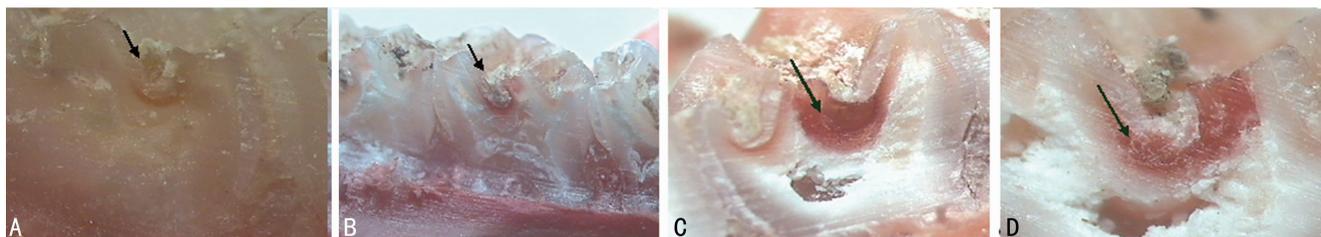


图 1 SD 大鼠磨牙殆面窝沟龋失面观
A: 大鼠磨牙殆面窝沟 E 级龋失面观 ($\times 25$); B: 大鼠磨牙殆面窝沟 Ds 级龋失面观 ($\times 20$); C: 大鼠磨牙殆面窝沟 Dm 级龋失面观 ($\times 25$); D: 大鼠磨牙殆面窝沟 Dx 级龋失面观 ($\times 25$)。

图 1 SD 大鼠磨牙殆面窝沟龋失面观

3 讨 论

口服疫苗成功的关键是机体在接种疫苗后能否产生全身免疫应答和黏膜免疫应答。全身免疫系统所产生的抗体以血清 IgG 为主, Shchelkunov 等^[10]构建出了含乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 抗体和含有 I 型人类免疫缺陷病毒 (HIV-1) 两种基因的双元载体, 将其转化的番茄果实喂养小鼠, 并在免疫后 14、28 d 于小鼠的血清和粪便中均检测到了抗 HIV 和乙型肝炎病毒的特异性抗体。而黏膜免疫系统所产生的抗体主要是唾液中的 SIgA, 是机体抵御病原微生物入侵的第一道防线, 可诱导全身其他部位的黏膜产生 SIgA, 对局部提供防御, 这是黏膜免疫保护作用的主要机制, 因此 SIgA 对于口服疫苗的免疫反应很有价值^[11-14]。理论上含变异链球菌抗致龋疫苗就是利用 SIgA 在黏膜表面形成的免疫防御屏障, 提供局部防御。防龋疫苗通过诱导黏膜产生特异性 SIgA 抗体, 产生有效免疫反应, 可能通过减少和阻止致龋菌在牙面的聚集和黏附来达到预防龋齿的作用; 改变细菌表面的理化性质, 刺激局部多核巨细胞产生吞噬和杀灭作用; 使细菌形成长链, 使其易于被清除, 从而减少致龋潜力, 最终降低龋病的发生、发展。本实验将表达 PAcP/CTB 目的蛋白的转基因番茄果汁通过灌胃方式免疫 SD 大鼠。本研究结果显示, 自免疫后第 3 周起, 无论是唾液中的特异性 IgA 抗体抑或是血清中的特异性 IgG 抗体均迅速升高, 同阴性对照组两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

能否通过口服的方式达到理想的免疫效应是可食用植物疫苗必须要面对的问题。郑雨燕等^[15]用转基因番茄防龋疫苗果实免疫小鼠, 结果显示不论是口服喂养还是腹腔下注射均可在其血清中检测到特异性抗 IgG 抗体, 且血清样本中的抗 PAc 的 IgG 抗体口服组与注射组差异无统计学意义。本研究同样采用了口服免疫的方法, 利用植物细胞壁保护抗原, 结果显示用转基因番茄果汁灌胃的动物与非转基因番茄果汁灌胃动物比较差异有统计学意义, 证实口服免疫的有效性。本课题组田源等^[16]用表达 PAcA/CTB 的转基因番茄免疫大白兔, 结果显示通过口服的方式可以诱导动物产生有效的系统免疫应答和黏膜免疫应答。

在龋病的攻击实验中, 龋齿的计分显示转基因番茄组与灭活变异链球菌组没有明显差异, 与非转基因番茄相比在 E 级、Ds 级、Dm 级差异有统计学意义, 说明转基因番茄对龋病的发生有一定的抑制作用, 提示口服免疫可能是转基因番茄防龋疫苗的一种方便有效的免疫途径, 可以诱导动物的保护性免疫应

答。但对于其最佳免疫剂量、最佳免疫方案及免疫耐受等问题还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] Li MY, Wang J, Lai GY. Effect of a dentifrice containing the peptide of streptococcal antigen I / II on the adherence of mutans streptococcus[J]. Arch Oral Biol, 2009, 54 (11): 1068-1073.
- [2] Kim JM, Kim JS, Park DH, et al. Improved recombinant gene expression in CHO cells using matrix attachment regions[J]. J Biotechnol, 2004, 107(2): 95-105.
- [3] Childers NK, Li F, Dasanayake AP, et al. Immune response in humans to a nasal boost with Streptococcus mutans antigens [J]. Oral Microbiol Immunol, 2006, 21(5): 309-313.
- [4] Smith DJ, King WF, Barnes LA, et al. Immunogenicity and protective immunity induced by synthetic peptides associated with putative immunodominant regions of Streptococcus mutans glucan-binding protein B[J]. Infect Immun, 2003, 71(3): 1179-1184.
- [5] 杨锦波, 刘天佳, 周学东. 变形链球菌葡糖基转移酶真核表达质粒 PcDNA3-gtfB 的构建[J]. 华西口腔医学杂志, 2001, 19(4): 249-252.
- [6] Jia R, Guo JH, Fan MW, et al. Immunogenicity of CTLA4 fusion anti-caries DNA vaccine in rabbits and monkeys [J]. Vaccine, 2006, 24(24): 5192-5200.
- [7] 唐琳. 变形链球菌表面蛋白 P 区与霍乱毒素 B 亚单位融合基因植物表达载体的构建及转化番茄研究[D]. 遵义: 遵义医学院, 2005.
- [8] 顾瑜, 刘建国, 关薇薇, 等. 变异链球菌表面蛋白 PAcP 与霍乱毒素 B 亚单位融合基因在转基因番茄中的表达[J]. 上海口腔医学, 2014, 23(3): 261-265.
- [9] 杨德琴, 刘天佳, 曹福娟, 等. 变形链球菌表面蛋白和葡糖基转移酶基因疫苗防龋动物实验: Keyes 龋齿计分研究 [J]. 实用口腔医学杂志, 2004, 20(5): 589-593.
- [10] Shchelkunov SN, Salyaev RK, Pozdnyakov SG, et al. Immunogenicity of a novel, bivalent, plant-based oral vaccine against hepatitis B and human immunodeficiency viruses[J]. Biotechnol Lett, 2006, 28(13): 959-967. (下转第 3175 页)

建霞^[1]认为抗 CTLA-4 抗体与 JAK2 抑制剂在提高荷瘤机体的免疫能力方面可能发挥了协同效应。本组研究为发现,抗 CTLA-4 抗体与阿霉素可协同提高小鼠机体免疫能力。

阿霉素可直接嵌入 DNA 碱基对之间,来抑制 RNA 和 DNA 的合成,达到细胞凋亡的作用,而抗 CTLA-4 抗体主要通过提高机体的抗体免疫能力起到肿瘤杀伤作用^[13-15]。本研究发现,二者联用其促细胞凋亡作用增强,联合用药组肿瘤细胞凋亡的阳性百分率显著高于其他组($P < 0.05$)。肿瘤长到几个立方毫米时处于缺氧状态,可分泌缺氧诱导因子促进 MD-SC 的形成和 CD4⁺T 细胞向 Treg 分化,分泌趋化因子和内皮生长因子等诱导肿瘤血管生成,从而促进肿瘤细胞生长。联合用药组 MVD 显著低于其他组,且单用抗 CTLA-4 抗体组和单用阿霉素组肿瘤细胞凋亡的阳性百分率显著低于空白组和溶剂组($P < 0.05$),提示联合用药可显著降低肿瘤 MVD,达到抑制肿瘤生长的目的,效果高于单一用药。

综上所述,联合抗 CTLA-4 抗体和阿霉素可在一定程度提高小鼠机体免疫力,明显抑制乳腺癌小鼠肿瘤生长,促进肿瘤微环境中肿瘤细胞凋亡,减少肿瘤微环境中微血管生成,效果优于单一用药。

参考文献

- [1] 王建霞. 联合抗 CTLA-4 抗体及 JAK2 抑制剂治疗小鼠乳腺癌的实验研究[D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [2] 吴介恒, 杨安钢, 温伟红. 治疗性抗体用于肿瘤治疗的临床转化研究现状[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2014, 21(3): 325-333.
- [3] Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 252-264.
- [4] Mocellin S, Nitti D. CTLA-4 blockade and the renaissance of cancer immunotherapy[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1836(2): 187-196.
- [5] 许静, 李晶, 杨杨, 等. 抗 CTLA-4 嵌合抗体的制备及生物
- [11] Zhou B, Zhang Y, Wang X, et al. Oral administration of plant-based rotavirus VP6 induces antigen-specific IgAs, IgGs and passive protection in mice[J]. Vaccine, 2010, 28(37): 6021-6027.
- [12] Yan H, Yan H, Li G, et al. Expression of human cytomegalovirus pp150 gene in transgenic Vicia faba L. and immunogenicity of pp150 protein in mice[J]. Biologicals, 2010, 38(2): 265-272.
- [13] 王利, 赵凯, 陈琦, 等. 肠毒素大肠杆菌 LT-B 基因转基因马铃薯口服免疫原性研究[J]. 科学技术与工程, 2011, 11(27): 6560-6563.
- [14] Khandelwal A, Renukaradhy GJ, Rajasekhar M, et al.

学活性鉴定[J]. 现代免疫学, 2012, 32(5): 359-364.

- [6] Yuan JD, Ginsberg B, Page D et al. CTLA-4 blockade increases antigen-specific CD8⁺T cells in prevaccinated patients with melanoma; three cases [J]. Cancer Immunol Immunother, 2011, 60(8): 1137-1146.
- [7] Curran M, Allison JP, Kim M, et al. Combination CTLA-4 blockade and 4-1BBActivation enhances tumor rejection by increasing T-Cell infiltration, proliferation, and cytokine production[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e19499.
- [8] 朱红梅, 胡婷, 杨媚, 等. 小鼠乳腺癌动物模型中调节性 T 细胞的动态检测及其实验意义[J]. 四川大学学报: 医学版, 2012, 43(6): 877-881.
- [9] Watanabe MA, Oda JM, Amarante MK, et al. Regulatory T cells and breast cancer: implications for immunopathogenesis[J]. Cancer Metastasis Rev, 2010, 29(4): 569-579.
- [10] 钦传辉, 黄平, 莫军扬, 等. Ki-67 在乳腺癌新辅助化疗中的表达及与病理学相关性研究[J]. 重庆医学, 2010, 39(5): 545-546.
- [11] 刘晓东. 新型光动力疗法联合阿霉素治疗乳腺癌的基础实验研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2012.
- [12] 王平虎. CD147 调控阿霉素介导的乳腺癌细胞凋亡的研究[D]. 长沙: 中南大学湘雅医院, 2013.
- [13] 李刚, 刘良忠, 熊德明, 等. 三维适形放疗联合鸦胆子油乳介入治疗原发性肝癌临床研究[J]. 重庆医学, 2012, 41(3): 238-243.
- [14] 张昭军, 周洋, 阿尔孜古丽·吐尔逊, 等. 左旋棉酚联合低浓度阿霉素诱导纤维肉瘤细胞凋亡及其机制[J]. 重庆医学, 2013, 42(20): 2372-2375.
- [15] Fan TY, Zhang L, Chen W. Feasibility of MRI-guided high intensity focused ultrasound treatment for adenomyosis[J]. Eur J Radiol, 2012, 81(11): 3624-3630.

(收稿日期: 2015-02-18 修回日期: 2015-07-15)

(上接第 3171 页)

- [11] Zhou B, Zhang Y, Wang X, et al. Oral administration of plant-based rotavirus VP6 induces antigen-specific IgAs, IgGs and passive protection in mice[J]. Vaccine, 2010, 28(37): 6021-6027.
- [12] Yan H, Yan H, Li G, et al. Expression of human cytomegalovirus pp150 gene in transgenic Vicia faba L. and immunogenicity of pp150 protein in mice[J]. Biologicals, 2010, 38(2): 265-272.
- [13] 王利, 赵凯, 陈琦, 等. 肠毒素大肠杆菌 LT-B 基因转基因马铃薯口服免疫原性研究[J]. 科学技术与工程, 2011, 11(27): 6560-6563.
- [14] Khandelwal A, Renukaradhy GJ, Rajasekhar M, et al.

Immune responses to hemagglutinin-neuraminidase protein of peste des petits ruminants virus expressed in transgenic peanut plants in sheep[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2011, 140(3/4): 291-296.

- [15] 郑雨燕, 凌均荣, 麦穗. 转基因番茄可食用防龋疫苗免疫 BALB/c 鼠的实验初探[J]. 口腔医学研究, 2007, 23(1): 7-9.
- [16] 田源, 刘建国, 白国辉, 等. 表达嵌合体蛋白 PAcA/CTB 的转基因番茄口服免疫大白兔的实验研究[J]. 口腔医学研究, 2013, 29(3): 201-204.

(收稿日期: 2015-02-08 修回日期: 2015-07-14)