

• 论 著 •      doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.10.001  
网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20181227.1640.006.html>(2018-12-28)

# 牙周炎基因疫苗 pVAX1-HA2-FimA、pVAX1-HA2-FimA/IL-15 经鼻黏膜免疫 SD 大鼠的实验研究\*

曾凤娇<sup>1,2</sup>, 杨 琳<sup>3</sup>, 刘建国<sup>1,2</sup>, 于 航<sup>1</sup>, 陈 靖<sup>1,2</sup>, 白国辉<sup>2△</sup>  
(1. 遵义医科大学口腔学院, 贵州遵义 563000; 2. 贵州省普通高等学校口腔疾病研究特色  
重点实验室, 贵州遵义 563000; 3. 贵阳市口腔医院综合科 550000)

**[摘要]** **目的** 观察牙周炎基因疫苗 pVAX1-血凝集素黏附结构域(HA2)-菌毛蛋白(FimA)、pVAX1-HA2-FimA/白细胞介素(IL)-15 经鼻黏膜免疫 SD 大鼠后的免疫原性及其目的蛋白在免疫部位的表达。**方法** 32 只 SD 大鼠分为 4 组, A 组: pVAX1-HA2-FimA 组; B 组: pVAX1-HA2-FimA/IL-15 组; C 组: pVAX1 组; D 组: 生理盐水组, 共免疫 3 次。利用酶联免疫吸附实验(ELISA)测定免疫后大鼠唾液分泌型 IgA(sIgA) 抗体水平, 通过免疫组织化学检测鼻黏膜目的蛋白的表达。**结果** A、B 组基因疫苗免疫 SD 大鼠, 唾液标本中 sIgA 型抗 HA2 抗体和抗 FimA 抗体水平在免疫第 1 周开始上升, 2~5 周逐步上升, 于第 5 周达到高峰, 自第 6 周开始缓慢下降, 第 9 周抗体基本降到免疫前水平。C 组及 D 组的抗体水平较低且无明显起伏变化。含有 IL-15 免疫佐剂重组质粒免疫组可诱导更高水平的抗体反应。免疫组织化学观察到鼻黏膜组织黏膜固有层存在目的蛋白的表达; HA2 蛋白主要在细胞质中表达, FimA 蛋白则分布在细胞质及细胞间质中。**结论** 牙周炎基因疫苗能够成功诱导实验大鼠共同黏膜免疫系统产生免疫应答, 具有免疫原性。IL-15 作为牙龈卟啉单胞菌基因疫苗的佐剂可增强免疫效果。

**[关键词]** 牙髓卟啉单胞菌; 鼻黏膜; 佐剂, 免疫; 基因疫苗  
**[中图法分类号]** R781.4+2      **[文献标识码]** A      **[文章编号]** 1671-8348(2019)10-1621-04

## Experiment of the periodontitis gene vaccine pVAX1-HA2-FimA and pVAX1-HA2-FimA/IL-15 by intranasal immunization in SD rats\*

ZENG Fengjiao<sup>1,2</sup>, YANG Lin<sup>3</sup>, LIU Jianguo<sup>1,2</sup>, YU Hang<sup>1</sup>, CHEN Jing<sup>1,2</sup>, BAI Guohui<sup>2△</sup>  
(1. School of Stomatology, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China;  
2. Key Laboratory of Oral Disease of Higher Schools in Guizhou Province, Zunyi, Guizhou 563000, China;  
3. Department of General, Guiyang Stomatological Hospital, Guiyang, Guizhou 550000, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the immune effect of periodontitis vaccine pVAX1-HA2-FimA and pVAX1-HA2-FimA/IL-15 in rats by intranasal immunization, and investigate the expression of interest protein in situ. **Methods** 32 SD rats were divided into 4 groups, group A: the pVAX1-HA2-FimA group; group B: the pVAX1-HA2-FimA/IL-15 group; group C: the pVAX1 group; group D: the normal saline group. All rats were immunized three times. The secretory IgA (sIgA) antibodies were detected by ELISA and the expression of interest protein were detected by immunohistochemistry technique. **Results** The levels of sIgA anti-HA2 antibody and anti-FimA antibody in saliva of SD rats in group A and B began to rise at the first week of immunity, and gradually increased during the second to fifth weeks, reached the peak at the fifth week, and slowly decreased from the sixth week, reduced to the pre-immunity level at the ninth week. Antibody levels were low and did not fluctuate significantly. The antibody contained IL-15 immune adjuvant recombinant plasmid induced a higher level of antibody response. The expression of interest protein in the inherent mucosa of nasal mucosa was observed by immunohistochemistry. HA2 protein is mainly expressed in the cytoplasm, while FimA protein is distributed in the cytoplasm and interstitium. **Conclusion** Periodontitis gene vaccine can successfully induce immune responses in the common mucosal immune system by intranasal immunization in rats. IL-15 can be used as adjuvant of porphyromonas gingival gene vaccine to enhance the immune effect.

**[Key words]** porphyromonas endodontalis; nasal mucosa; adjuvants, immunologic; gene vaccine

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81560186); 贵州省科技厅社发攻关项目(黔科合 SY 字[2013]3043 号)。 作者简介: 曾凤娇(1992—), 在读硕士, 主要从事牙周病的病因与免疫学防治的研究。 △ 通信作者, E-mail: baiguohui1228@126.com。

牙周病以其较高的发生率及危害性影响着 1/3 成人及超过 1/2 的 65 岁以上老年人的牙齿健康,同时与全身的一些系统性疾病也有一定关系。因此,探寻一种能够有效预防和治疗牙周病的方法对解决牙周病带来的各种危害有着重要的现实意义。研究认为,牙周病是由寄生菌以菌斑生物膜为主要的存在形式,寄生于口腔及局部微生态环境,使一些厌氧致病菌滋生、定植并破坏宿主的细胞结构引起的<sup>[1]</sup>。牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, P. g) 利用补体系统诱发菌群及微环境失调,破坏宿主的防御系统而引发病变,目前普遍认为对于慢性牙周病具有明确的致病作用<sup>[2]</sup>。P. g 黏附定植于宿主细胞,是发挥破坏作用的基础。P. g 表面含有菌毛、牙龈素、脂多糖、外膜蛋白、血凝素和蛋白酶等大量毒力因子,其中表面重要的致病因子菌毛和牙龈素在 P. g 的黏附和定植中起重要作用。菌毛蛋白(fimbriin, FimA)作为菌毛主要的亚单位,是菌毛发挥黏附作用的重要因子。在口腔环境中,FimA 可通过与宿主细胞外部分子特异性地结合来促进细菌的定植,以及与牙龈斑内其他菌体表面蛋白相结合进一步促进菌斑生物膜成熟而发挥致病作用。牙龈素作为特异性半胱氨酸蛋白酶,编码基因分别为 *rgpA*、*rgpB* 和 *kgp*。其中 *rgpA* 基因包括血凝集素黏附结构域(hemagglutinin A, HA)和催化结构域。HA 基因又分为编码 HA1~4 结构域的 4 段,其中 HA2 为 P. g 的关键区域。有文献显示菌毛的表达可影响牙龈素的合成,而牙龈素亦可通过其蛋白水解活性影响菌毛的成熟,二者在黏附过程中可能是协同发挥作用<sup>[3]</sup>。因此,本实验选择联合使用 FimA 和牙龈素抗原基因构建的基因疫苗作为免疫原,通过黏膜免疫的方式作用于 SD 大鼠,观察其对于 SD 大鼠牙周炎产生的免疫防御作用。本实验组前期已经成功制备了牙周炎基因疫苗 pVAX1-HA2-FimA、pVAX1-HA2-FimA/白细胞介素(IL)-15<sup>[4]</sup>。并证实目的基因 HA2、FimA 在 mRNA 水平能够被正确表达,以及制备了相应的蛋白抗原,应用聚合酶链反应(PCR)、Western blot、酶联免疫吸附实验(ELISA)等证实目的基因在体外能够被正确表达。本次实验在前期基础上,通过牙周炎基因疫苗经鼻黏膜免疫 SD 大鼠后,检测唾液中相关的特异性抗体水平变化,观察该基因疫苗的免疫原性。初步探索牙周病基因疫苗免疫防治牙周病的机制及可行性,同时为下一步牙周炎基因疫苗的临床应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 7 周龄的 SD 雌性大鼠 32 只,体质量 150 g 左右,购自第三军医大学野战外科研究所

动物室。质检单位:重庆市实验动物质检中心。许可证号:SCXK(渝)2012-0005。

**1.1.2 重组质粒及主要试剂** 牙周炎基因疫苗 pVAX1-HA2-FimA、pVAX1-HA2-FimA/IL-15, 空载体 pVAX1, HA2、FimA 抗原为课题组前期构建和保存。Goat anti-Mouse IgA Cross-Adsorbed(Thermo 公司,美国);牛血清清蛋白(BSA, Amresco 公司,美国);Secondary Antibody,辣根过氧化物酶标记的单抗大鼠 IgA(基因有限公司,中国);戊巴比妥钠(哈灵生物科技有限公司,中国);2%硝酸毛果芸香碱(山东正大福瑞达制药有限公司,中国)。

### 1.2 方法

**1.2.1 主要试剂配制** ELISA 相关试剂配置详见参考文献[5]。

**1.2.2 实验动物分组与免疫** 32 只 7 周龄雌性 SD 大鼠平均分组,每组 8 只。实验组:A、B 组,对照组:C、D 组。具体如下:A 组 pVAX1-HA2-FimA 组;B 组 pVAX1-HA2-FimA/IL-15 组;C 组 pVAX1 组;D 组生理盐水组。在第 0、7、14 天对大鼠进行牙周炎基因疫苗免疫,免疫途径为双侧鼻黏膜免疫。免疫剂量为  $200 \mu\text{g} \cdot \text{次}^{-1} \cdot \text{只}^{-1}$  ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ),免疫次数为 3 次。

**1.2.3 标本采集** 唾液标本采集时间:免疫前 1 d 及免疫后每周,连续收集 9 周。采集方式:腹腔注射药物,2%硝酸毛果芸香碱( $0.3 \text{ mL}/100 \text{ g}$ ),约 1 min 后开始收集唾液,每只收集量约 0.5 mL。 $4^\circ\text{C}$ , 12 000 r/min 离心 15 min,弃杂质沉淀, $-80^\circ\text{C}$  保存备用。

**1.2.4 唾液中分泌型 IgA(sIgA)抗体水平检测** 采用间接 ELISA 法。以交叉连续稀释分析法确定出酶标抗体过氧化物酶标记羊抗大鼠 IgA 最佳工作比例为 1:4 000,HA2、FimA 抗原最佳包被浓度为  $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ;唾液标本最佳稀释比例 1:4。按浓度梯度包被 96 孔酶标板,5% BSA 封闭,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  唾液标本[含吐温-20 的磷酸盐缓冲液(PBST)1:4 稀释]。 $37^\circ\text{C}$  湿盒温育 2 h,加入 100  $\mu\text{L}$  辣根过氧化物酶标记羊抗大鼠 IgA 抗体(二抗,1:4 000),加入底物显色,酶标仪检测记录 450 nm 处吸光度( $A_{450}$ )值。

**1.2.5 免疫部位目的蛋白的表达的检测** 免疫后第 5 周每小组取 2 只大鼠处死,分离鼻黏膜,固定、包埋,5  $\mu\text{m}$  连续切片,免疫组织化学检测。先进行抗原修复(HA2:0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液,加热 10.5 min; FimA:0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液,加热 12.0 min)。所用抗体如下:一抗为根据预实验确定的 HA2、FimA (1:200),阴性对照以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗,4  $^\circ\text{C}$  过夜;二抗为 HRP 标记的第二抗体,37  $^\circ\text{C}$  20 min。二氨基联苯胺(DAB)染色液显色,常规透明、脱水和封片。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS21.0 统计软件分析。所有计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组之间比较采用单因素方差分析法;两组间比较方差齐用 LSD 检验,方差不齐用 Tamhane 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

**2.1 唾液中特异性抗体检测**唾液中 sIgA 型抗 HA2 抗体水平的观察 第 1 周开始,实验组抗体即产生,2~5 周逐步上升,第 5 周达到高峰;抗体水平从第 6 周开始下降,第 9 周逐渐接近免疫前水平。对照组维持较低抗体水平且起伏变化不明显。B 组免疫诱导的唾液 sIgA 型抗 HA2 抗体水平比 A 组高,第 8 周 A 组抗体水平接近免疫前,而 B 组在第 9 周表现出此现象(图 1、表 1)。

**2.2 唾液中 sIgA 型抗 FimA 抗体水平的观察** 免疫第 1 周,实验组抗体水平出现升高,2~5 周逐步上升,于第 5 周达到高峰。第 6 周开始,抗体平逐渐下降,其中 A 组下降速度较明显,第 9 周抗体水平与免疫前接近。C 组及 D 组维持较低抗体水平且起伏变

化不明显。B 组免疫诱导的唾液 sIgA 型抗 FimA 抗体水平较 A 组高(图 2、表 2)。

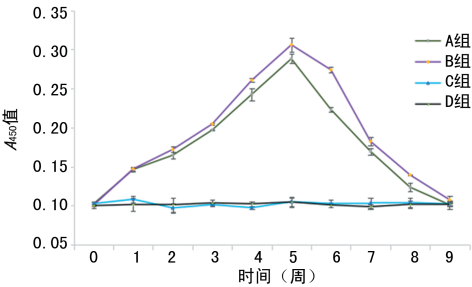


图 1 大鼠唾液中 sIgA 型抗 HA2 抗体水平趋势图

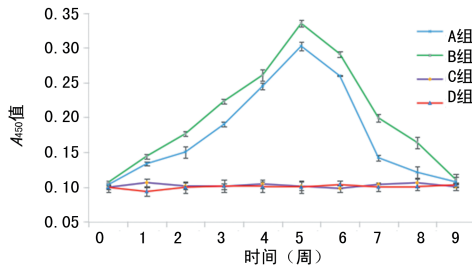


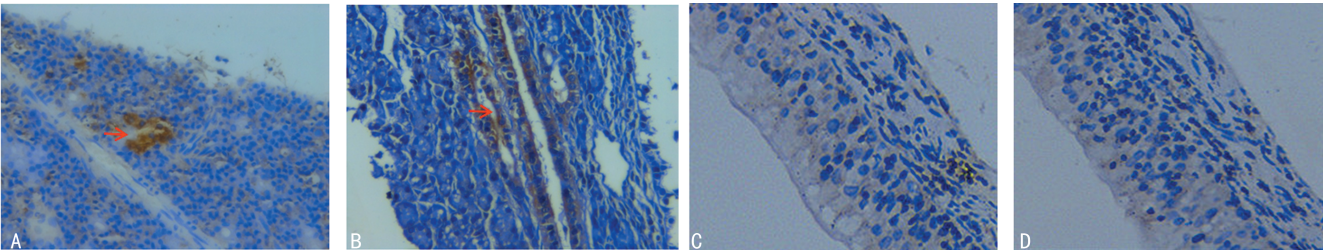
图 2 大鼠唾液中 sIgA 型 FimA 抗体水平趋势图

表 1 各组 SD 大鼠唾液中 sIgA 型抗 HA2 抗体 A<sub>450</sub> 值组间比较 P 值

| 组别      | 时间(周) |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|         | 0     | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     |
| A vs. B | 0.316 | 0.859 | 0.123 | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 0.000 | 0.003 | 0.001 | 0.053 |
| A vs. C | 0.883 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.697 |
| A vs. D | 0.227 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.690 |
| B vs. C | 0.255 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.106 |
| B vs. D | 0.823 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.107 |
| C vs. D | 0.180 | 0.116 | 0.381 | 0.157 | 0.150 | 0.940 | 0.549 | 0.173 | 0.523 | 0.993 |

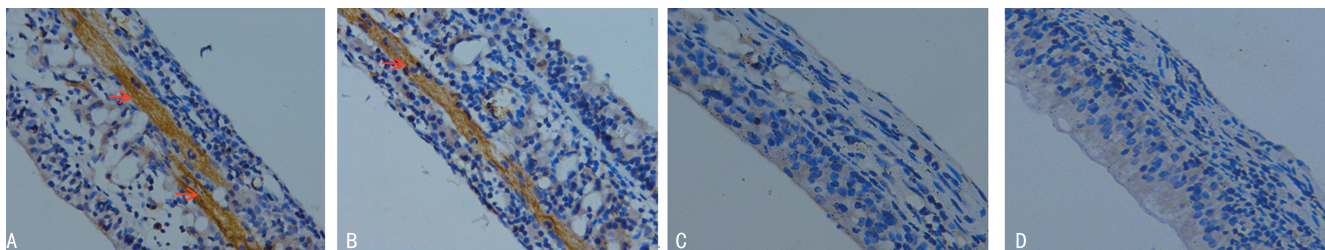
表 2 各组 SD 大鼠唾液中 sIgA 型抗 FimA 抗体 A<sub>450</sub> 值组间比较 P 值

| 组别      | 时间(周) |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|         | 0     | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     |
| A vs. B | 0.316 | 0.009 | 0.000 | 0.000 | 0.004 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.439 |
| A vs. C | 0.281 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.023 | 0.146 |
| A vs. D | 0.274 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.004 | 0.343 |
| B vs. C | 0.053 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.038 |
| B vs. D | 0.051 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.102 |
| C vs. D | 0.987 | 0.004 | 0.727 | 0.933 | 0.372 | 0.822 | 0.195 | 0.320 | 0.353 | 0.572 |



A:pVAX1-HA2-fimA 组;B:pVAX1-HA2-fimA/IL-15 组;C:pVAX1 组;D:生理盐水组

图 3 HA2 蛋白免疫组织化学定位(×400)



A:pVAX1-HA2-FimA 组;B:pVAX1-HA2-FimA/IL-15 组;C:pVAX1 组;D:生理盐水组

图 4 FimA 蛋白免疫组织化学定位( $\times 400$ )

**2.3 鼻黏膜目的蛋白的表达** HA2 蛋白在鼻黏膜固有层中黏液性腺泡、腺体及部分巨噬细胞质内见棕黄色目的蛋白的表达,阳性染色在对照组没有出现(图 3)。FimA 蛋白在鼻黏膜固有层中黏液性腺泡、腺体、骨骼肌、部分巨噬细胞质及细胞间质中见棕黄色目的蛋白的表达,阳性染色在对照组没有出现(图 4)。

### 3 讨论

自从明确了 *P. g* 在牙周炎中产生的影响以来,利用 *P. g* 毒力因子的抗原开发相关牙周病疫苗一直为该领域研究热点。有研究用基因疫苗 pCTLA4-fimA 免疫小鼠,观察到血清中特异性抗体 IgG,唾液中特异性抗体 IgA 增强,小鼠牙槽骨水平与免疫前相比吸收程度降低<sup>[6-7]</sup>。GIBSON 等<sup>[8]</sup> 也认为 rgpA 基因疫苗较 rgpB 能更有效地抑制牙槽骨吸收。研究发现在牙周炎患者的血清和龈沟液中存在 *P. g* 的特异性抗体,特异性抗体与疾病严重程度相关<sup>[9]</sup>,表明宿主的防御机制发生了激活,虽然其产生抗体不能完全消除 *P. g* 的感染,但这也提示可以通过开发针对 *P. g* 的基因疫苗去预防 *P. g* 诱导的牙周炎。

黏膜免疫作为人体的第一道防线,可以提供高效的保护作用。然而,大多数商业疫苗全身输送,只诱导体液免疫保护,而没有病原体特异性黏膜免疫<sup>[10]</sup>。鼻黏膜滴注免疫方式可以成功诱导体液免疫及黏膜共同免疫,具有无需专业人员操作即可大面积接种,给药方便安全,无痛苦,易接受等特点,对疫苗的推广普及具有重大意义。而且,鼻黏膜的血管及淋巴组织丰富,不规则程度更高,与其他部位黏膜相比更具有渗透性<sup>[11]</sup>,更有利于抗原的摄取。本实验所使用的牙周炎基因疫苗 pVAX1-HA2-FimA、pVAX1-HA2-FimA/IL-15 是前期由课题组以 FimA 与 HA2 联合,串联细胞因子 IL-15 所构建。通过对 SD 大鼠进行免疫观察发现,各实验组特异性抗体水平均较对照组及免疫前水平高,在免疫第 5 周抗体水平达到高峰。这可能与以鼻黏膜免疫作为免疫途径,从而诱导机体产生了体液免疫应答及黏膜共同免疫系统的免疫应答的效应有关。

黏膜免疫反应和口腔中防御病原体入侵的主要免疫球蛋白均为 sIgA。sIgA 主要来源于黏膜中的 B1 细胞,

IL-15 可以特异性地作用于被抗原致敏的 B1 细胞,诱导并促进其增殖<sup>[12]</sup>。国内有学者也证明 IL-15 对于基因疫苗产生的免疫反应是有正向调节作用的<sup>[13]</sup>。因此,本实验以检测唾液之中 sIgA 型特异性抗体的水平作为观察指标,并直接将 IL-15 基因串联入重组质粒中,避免了免疫操作复杂等问题。在疫苗免疫的过程中,由于免疫原性较弱,常常导致免疫耐受的发生,因而免疫佐剂便被应用于激发较强的黏膜免疫应答。目前黏膜免疫常用的佐剂包括肠毒素(CT)和霍乱毒素(LT),细胞因子也可作为佐剂增强 DNA 疫苗的黏膜免疫效果。本实验中选用 IL-15 作为免疫佐剂来增强免疫效应,在实验中疫苗免疫组 pVAX1-HA2-FimA/IL-15 相比免疫组 pVAX1-HA2-FimA 抗 HA2、FimA 特异性抗体水平更高,且使用 IL-15 佐剂免疫组抗体下降程度稍缓,这说明 IL-15 佐剂的使用可能有助于维持抗体高水平的持续时间,可以作为牙龈卟啉单胞菌疫苗的佐剂有效增强抗体的免疫水平。免疫后局部鼻黏膜组织进行免疫组织化学检测目的蛋白,显示在鼻黏膜骨骼肌、巨噬细胞、腺体和腺管内可见 FimA 的表达,由于其该蛋白为分泌型蛋白,可见其呈现弥散状分布于细胞质及细胞间质中。

本研究表明,以 HA2、FimA 基因联合的牙周炎基因疫苗能够成功诱导实验大鼠共同黏膜免疫系统产生免疫应答,对于牙周炎的预防有潜在价值。

### 参考文献

- [1] KOLENBRANDER P E, PALMER R J, PERIASAMY S, et al. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(7): 471-480.
- [2] TOKUTOMI F, WADA-TAKAHASHI S, SUGIYAMA S, et al. Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss is accelerated in the strokeprone spontaneously hypertensive rat [J]. *Archives of Oral Biology*, 2015, 60(6): 911-918.
- [3] SCHENKEIN H A, LOOS B G. Inflammatory mechanisms linking periodontal diseases to cardiovascular diseases [J]. *J Periodontol*, 2013, 84(4 Suppl): S51-69.
- [4] 苗晨琛. 牙龈卟啉单胞菌 HA2、fimA 基因重组质粒的构建及其表达的研究[D]. 遵义:遵义医学院, 2016. (下转第 1629 页)

EZH2 作为 PCR2 的催化亚基,能抑制转录,进而影响到下游重要的信号通路,在染色体水平调节基因活性,在干细胞的更新与维持中发挥重要作用<sup>[9-10]</sup>。有研究观察到,NSCs 向不同方向增殖分化时,EZH2 表达水平存在明显差异<sup>[11-12]</sup>:增殖的 NSCs 中高度表达,在 NSCs 向神经元细胞分化时,EZH2 表达水平降低,在 NSCs 向星形胶质细胞分化时,EZH2 表达完全停止,在 NSCs 向少突胶质细胞分化过程中,从少突胶质前体细胞分化到不成熟少突胶质细胞期间,EZH2 维持高水平表达<sup>[13]</sup>。在本研究中,成功过表达和干扰 EZH2 基因的表达之后,分别能够促进和抑制 NSCs 的增殖,影响细胞进入细胞周期的速度,而对细胞凋亡水平并未见显著影响;因而设法调节移植 NSCs 中 EZH2 基因的表达可以起到调控 NSCs 增殖的作用。另外,进一步的研究还发现,过表达 EZH2 基因,能够促进增殖相关蛋白 Cyclin D1 和 c-Myc 的表达,这可能是其调控细胞增殖潜在的分子机制,而具体的信号途径还需要进一步的分析和研究。

本实验结果表明,EZH2 能够在体外调控 NSCs 的增殖,为临床细胞学治疗脊髓损伤及相关疾病提供了实验依据。

参考文献

[1] GHANBARI A,ESMAEILPOUR T,BAHMANPOUR S,et al. Depletion of neural stem cells from the subventricular zone of adult mouse brain using cytosine b-Arabinofuranoside[J]. Brain Behav,2015,5(11):e00404.

[2] LEE I S,JUNG K,KIM I S,et al. Human neural stem cells alleviate Alzheimer-like pathology in a mouse model [J]. Mol Neurodegener,2015,10:38.

[3] 杨坦,刘华,王肇光,等. 应用于缺血缺氧性脑病治疗的神经干细胞移植:现实与未来[J]. 中国组织工程研究,2014,18(1):143-148.

(上接第 1624 页)

[5] 亓鹏. 温敏型生物降解水凝胶载体防龋基因疫苗不同途径免疫 SD 大鼠的实验研究[D]. 遵义:遵义医学院,2011.

[6] YU F,XU Q A,CHEN W. A targeted fimA DNA vaccine prevents alveolar bone loss in mice after intra-nasal administration[J]. J Clin Periodontol,2011,38(4):334-340.

[7] 于飞,朱光勋,陈卫民. 靶向牙周炎 DNA 疫苗免疫原性及免疫效能的实验研究[J]. 临床口腔医学杂志,2011,27(7):387-389.

[8] GIBSON F C 3rd,GENCO C A. Prevention of Porphyromonas gingivalis-induced oral bone loss following immunization with gingipain R1[J]. Infect Immun,2001,69(12):7959-7963.

[9] SHIMADA A,KOBAYASHI T,ITO S,et al. Expression of anti-Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase immunoglobulin G and peptidylarginine deiminase-4 in patients with rheumatoid arthritis and periodontitis[J].

[4] 陈德桂. 靶向 Ezh2 的肿瘤干细胞治疗策略[J]. 生命科学,2016,28(8):928-932.

[5] ZHANG J,JI F,LIU Y,et al. Ezh2 regulates adult hippocampal neurogenesis and memory[J]. J Neurosci,2014,34(15):5184-5199.

[6] ZHANG T,QIAN H,HU C,et al. MiR-26a mediates ultraviolet B-Induced apoptosis by targeting histone methyltransferase EZH2 depending on Myc expression [J]. Cell Physiol Biochem,2017,43(3):1188-1197.

[7] 陈晓丽,李少川,陈久智,等. 神经干细胞治疗脊髓损伤的研究近况[J]. 中国医药生物技术,2017,12(5):424-428.

[8] DOOLEY D,VIDAL P,HENDRIX S. Immunopharmacological intervention for successful neural stem cell therapy:new perspectives in CNS neurogenesis and repair [J]. Pharmacol Ther,2014,141(1):21-31.

[9] 张宝华,仇福成,董慈,等. 脑脊液途径移植神经干细胞治疗中枢神经系统疾病的研究现状[J]. 中国组织工程研究,2014,18(6):974-978.

[10] WANG S,WENG C,XU H,et al. Effect of optogenetic stimulus on the proliferation and cell cycle progression of neural stem cells[J]. J Membr Biol,2014,247(6):493-500.

[11] LEE Y,CHANG W,CHEN Y,et al. Hsp90 alpha mediates BMI1 expression in breast cancer stem/progenitor cells through facilitating nuclear translocation of c-Myc and EZH2 [J]. Int J Mol Sci,2017,18(9):1986.

[12] HWANG W,SALINAS R,SIU J,et al. Distinct and separable roles for EZH2 in neurogenic astroglia[J]. Elife,2014,3(1):e02439.

[13] AKIZU N,GARCIA M,ESTARAS C,et al. EZH2 regulates neuroepithelium structure and neuroblast proliferation by repressing p21[J]. Open Biol,2016,6(4):150227.

(收稿日期:2018-08-18 修回日期:2018-12-03)

J Periodontal Res,2016,51(1):103-111.

[10] WANG S,LIU H,ZHANG X,et al. Intranasal and oral vaccination with protein-based antigens:advantages,challenges and formulation strategies[J]. Protein Cell,2015,6(7):480-503.

[11] 吕朋君,李桂红,LYU P G,等. 可溶性抗血凝素和麦芽糖结合蛋白经鼻黏膜免疫诱导慢性牙周炎的抗体产生[J]. 国际免疫学杂志,2014,37(3):255-259.

[12] HIROI T,YANAGITA M,OHTA N,et al. IL-15 and IL-15 receptor selectively regulate differentiation of common mucosal immune system-independent B-1 cells for IgA responses[J]. J Immuno,2000,165(8):4329-4337.

[13] 王丹阳,杨雨,杨秀梅,等. PolyI : C 协同 IL-15 作为小鼠卵透明带 3 基因疫苗佐剂黏膜免疫效果的观察[J]. 中国生物工程杂志,2015,35(9):7-13.

(收稿日期:2018-08-18 修回日期:2018-11-25)