

枯草芽孢杆菌芽孢对猪扁桃体内树突状细胞的影响

申育萌, 杨倩*

(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: 拟研究滴鼻给予猪鼻枯草芽孢杆菌芽孢对咽鼓管扁桃体和软腭扁桃体内树突状细胞数量的影响。10头2月龄杜长大三元杂交仔猪随机分为2组, 分别用枯草芽孢杆菌芽孢和PBS进行鼻腔滴鼻, 3h后打开鼻腔取出咽鼓管扁桃体和软腭扁桃体。选用MHCII、CD11b和CD16三种猪树突状细胞(DCs)抗体, 对咽鼓管扁桃体和软腭扁桃体内DCs进行标记, 通过共聚焦显微镜观察滴鼻前后DCs的变化情况。结果表明: 应用枯草芽孢杆菌芽孢滴鼻后, 咽鼓管扁桃体固有层和淋巴小结内CD11b⁺CD16⁺DCs和CD11b⁺MHCII⁺DCs的数量显著增加($P < 0.05$), 是正常对照的2~3倍; 软腭扁桃体固有层和淋巴小结内CD11b⁺CD16⁺DCs和CD11b⁺MHCII⁺DCs的数量也显著增加($P < 0.05$); 并且CD11b⁺MHCII⁺DCs数量比CD11b⁺CD16⁺DCs多, 但差异不显著。笔者的研究提示枯草芽孢杆菌芽孢滴鼻能够诱导树突状细胞在扁桃体内聚集, 并促进树突状细胞成熟, 从而有效提高扁桃体抵抗病原微生物入侵的能力。

关键词: 猪; 咽鼓管扁桃体; 软腭扁桃体; 枯草芽孢杆菌芽孢; 树突状细胞

中图分类号: S852.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)05-0849-06

Effects of Intranasal Administration with *Bacillus subtilis* Spores on the Dendritic Cells in Porcine Tonsils

SHEN Yu-meng, YANG Qian*

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

Abstract: Pigs were administrated by intranasal with *Bacillus subtilis* spores. Three hours later, the numbers of dendritic cells (DC) in tonsils were studied. Ten crossed-bred (Duroc × Landrace × Yorkshshire) pigs aged 2 months were randomly divided into two groups, Nasal administration with PBS or *Bacillus subtilis* spores respectively. Three hours later, the tube tonsils and soft palate tonsils were sampled and prepared tissue slices. Three anti-porcine dendritic cells antibodies, MHCII, CD11b and CD16 were used to examined the changes of tonsil DC in porcine tonsils. Our results showed that: after intranasal administration of *Bacillus subtilis* spores, the numbers of CD11b⁺CD16⁺ DCs and CD11b⁺MHCII⁺ DCs in tube tonsils have increased significantly ($P < 0.05$), approximately two or three times higher than normal controls; the numbers of CD11b⁺CD16⁺ DCs and CD11b⁺MHCII⁺ DCs in soft palate tonsils have increased significantly also ($P < 0.05$). Moreover, the numbers of CD11b⁺MHCII⁺ DCs were higher than CD11b⁺CD16⁺ DCs, but the difference was not significant. These results suggested that intranasal administration with *Bacillus subtilis* spores could induce accumulation of dendritic cells in tonsils and promote dendritic cell maturation, therefore effectively improve the ability of tonsils to resist pathogens invasion.

Key words: porcine; tube tonsils; soft palate tonsils; *Bacillus subtilis* spores; dendritic cells

收稿日期: 2014-08-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372465)

作者简介: 申育萌(1989-), 女, 海南海口人, 硕士生, 主要从事黏膜免疫及佐剂的研究, E-mail: sym_penguins@163.com, Tel: 025-84395817

* 通信作者: 杨倩, 教授, E-mail: zxbyq@njau.edu.cn

猪的上呼吸道中分布有较多的淋巴组织,尤其是咽鼓管扁桃体和软腭扁桃体,它们位于呼吸道和消化道的入口处,是机体防御病原微生物入侵机体的第一道防线^[1]。正常状态下,树突状细胞(dendritic cells, DCs)在猪的扁桃体内呈散在分布,有 CD11b⁺ CD16⁺ DCs 和 CD11b⁺ MHCII⁺ DCs 两种不同类型^[2]。黏膜 DCs 可伸出突起跨过上皮细胞摄取抗原,将抗原呈递给 T、B 淋巴细胞^[3]。因此,DCs 在启动黏膜免疫反应中发挥重要作用。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是广泛存在于土壤和植物中的优势生物种群^[4]。研究发现,枯草芽孢杆菌是 Toll 样受体 2 (Toll-like receptors, TLR) 的配体,它可与上皮细胞或与 DCs 的表面 TLR2 和 TLR4 结合,通过诱导上皮细胞分泌细胞因子,促进 DCs 的成熟从而提高局部和全身免疫水平^[5]。芽孢型的枯草芽孢杆菌比滋养型枯草芽孢杆菌具有更多的抗原位点,可引起更广泛的免疫反应,是滋养型枯草芽孢杆菌的良好替代品^[6]。如果枯草芽孢杆菌芽孢也能诱导扁桃体内 DCs 的分化和成熟,将会提高鼻腔局部黏膜免疫水平。因此,本研究选用枯草芽孢杆菌芽孢给仔猪滴鼻,探讨扁桃体内树突状细胞分布和变化,为提高仔猪鼻腔免疫提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

枯草芽孢杆菌 RJGP16 (*Bacillus subtilis* RJGP16)由南京农业大学植物保护学院高学文教授

赠送。用肉汤培养基 [加入 1 mmol · L⁻¹ Ca(NO₃)₂, 10 nmol · L⁻¹ MnCl₂, 1 nmol · L⁻¹ FeSO₄] 37 °C 振荡培养 48 h, 80 °C 水浴 30 min 杀灭未形成芽孢的滋养体。分光光度计测其浓度后 3 000 × g 离心,再用无菌 PBS 悬浮至 1.0 × 10⁹ CFU · mL⁻¹ 洗 5 遍后保存于 -70 °C 冰箱。

1.2 动物及处理

10 头 2 月龄健康雄性杜长大三元杂交猪(江浦农场提供)随机分成 2 组,每组 5 头。每组单独饲养于江苏省农业科学院,充足饮水,自由采食。第 1 组应用 PBS 滴鼻作为对照;第 2 组应用枯草芽孢杆菌芽孢滴鼻(芽孢数 1.0 × 10⁸ CFU · mL⁻¹ · 头⁻¹)。滴鼻 3 h 后处死实验动物并即刻取下咽鼓管扁桃体和软腭扁桃体。组织样品经 0.9% 氯化钠溶液冲洗后放入新鲜配制的 4% 多聚甲醛溶液中进行固定。

1.3 冰冻切片的制备及荧光染色

4 °C 固定组织 24 h 后用 OTC(南京友乐博科学仪器有限公司)包被组织块冻存于 -20 °C。制作 8~10 μm 的冰冻切片(冰冻切片,Leica CM 1850)。组织切片常规破膜和封闭后滴加一抗和相应的荧光二抗进行孵育(表 1)。孵育结束后用 0.01% PBS 洗脱未结合的抗体。最后 DAPI (Invitrogen)着色细胞核。制备好的组织切片用激光共聚焦显微镜(Axio LSM 710)观察。每头猪软腭扁桃体和咽鼓管扁桃体各选取 12 张切片,其中 6 张共染 CD11b、MHCII 分子抗体,另外 6 张共染 CD11b、CD16 分子抗体。每张切片组织固有层和淋巴滤泡层各随机选取 10 个视野进行拍照。

表 1 抗体信息

Table 1 Information of antibodies

抗体 Antibody	名称 Name	特异性 Specificity	稀释倍数 Dilution	货号 Code number	供应商 Supplier
一抗 Primary antibody	CD11b	兔抗人 Rabbit anti human	1 : 100~1 : 500	Ab52478	Abcam, 香港 Abcam, Hongkong
	HMHC-II	小鼠抗猪 Mouse anti swine	1 : 400~1 : 600	ab20181	
	CD16	小鼠抗猪 Mouse anti swine	1 : 60~1 : 400	ab124042	
二抗 Secondary antibody	Dylight 649	羊抗兔 Gota anti rabbit	1 : 200	LK-GAR6492	联科生物技术 有限公司 LiankeBio Co. Ltd
	Dylight 488	羊抗小鼠 Goat anti mouse	1 : 200	LK-GAM4881	

1.4 统计处理

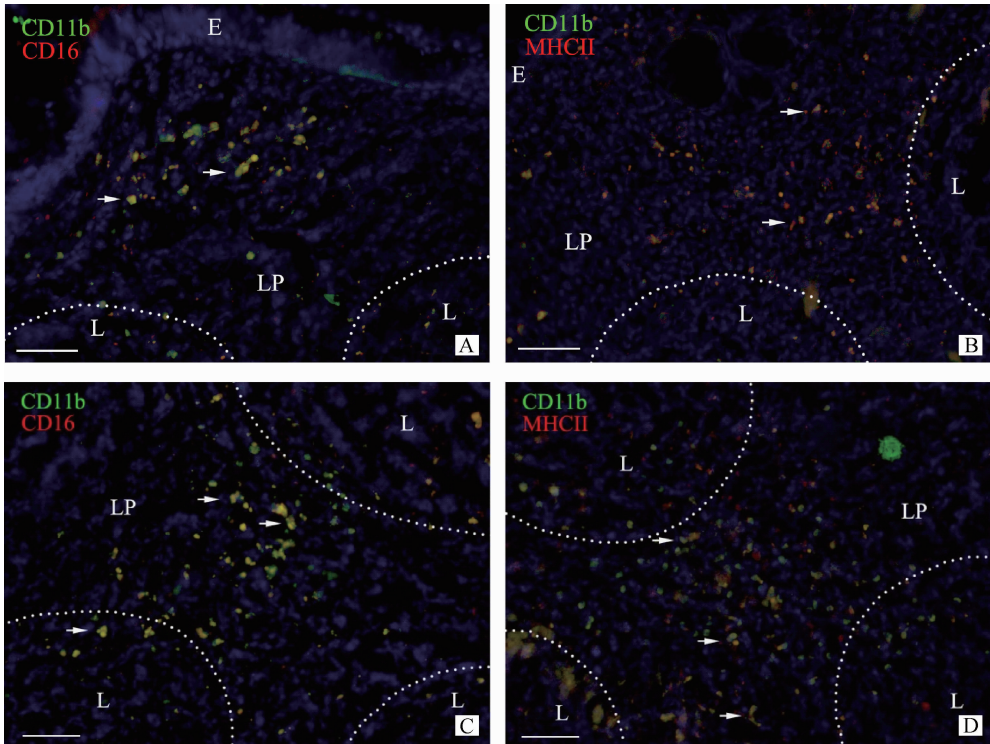
采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统对橘黄色的双染阳性细胞进行计数,并用 SPSS 16.0 分析软件(Chicago,IL)对试验数据进行统计分析,差异显著性试验采用独立样本 t 检验。差异显示性判断标准: $P<0.01$ 为差异极显著, $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 枯草芽孢杆菌芽孢对咽鼓管扁桃体树突状细胞数量的影响

正常对照组的黏膜 $CD11b^+ CD16^+$ DCs 和 $CD11b^+ MHCII^+$ DCs 在咽鼓管扁桃体固有层和淋巴小结内均散在分布, $CD11b^+ CD16^+$ 和 $CD11b^+ MHCII^+$ 阳性细胞细胞质呈现黄色或橘黄色,形态不规则,呈多边形或圆形,数量较少(图 1)。

应用枯草芽孢杆菌芽孢滴鼻 3 h 后(图 1A、B)阳性细胞形态不改变,呈黄色或橘黄色(箭头所示)。 $CD11b^+ CD16^+$ DCs 和 $CD11b^+ MHCII^+$ DCs 分布在上皮细胞下层,聚集在固有层内。从图 2A 可见,应用枯草芽孢杆菌芽孢滴鼻 3 h 后能够显著增加($P<0.05$)咽鼓管扁桃体固有层内 $CD11b^+ CD16^+$ DCs 和 $CD11b^+ MHCII^+$ DCs 的数量, $CD11b^+ CD16^+$ DCs 数量增幅为 1.5 倍; $CD11b^+ MHCII^+$ DCs 数量增幅为 2 倍。从图 2B 可见,应用枯草芽孢杆菌芽孢滴鼻 3 h 后咽鼓管扁桃体淋巴小结内 $CD11b^+ CD16^+$ DCs 和 $CD11b^+ MHCII^+$ DCs 的数量显著增加($P<0.05$), $CD11b^+ CD16^+$ DCs 数量增幅为 2 倍; $CD11b^+ MHCII^+$ DCs 数量增幅为 2.7 倍。咽鼓管扁桃体中 $CD11b^+ MHCII^+$ DCs 数量虽稍高于 $CD11b^+ CD16^+$ DCs,但无较大差异。

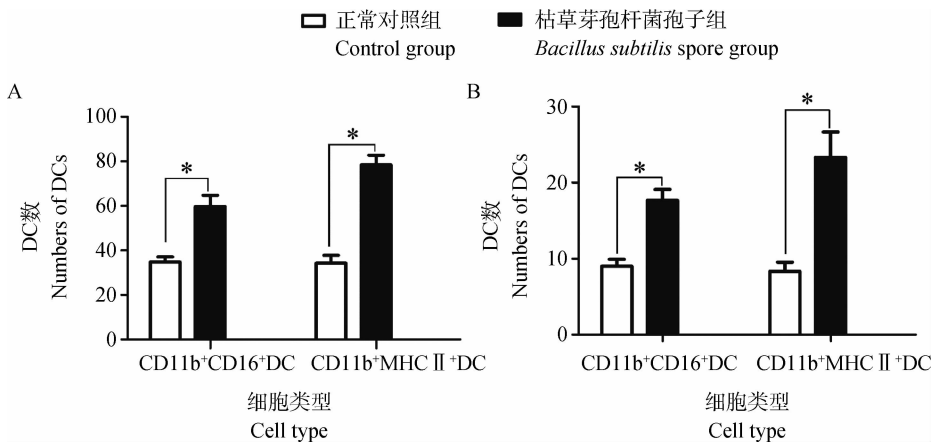


A. 咽鼓管扁桃体内 $CD11b^+ CD16^+$ DCs 的分布, $CD11b$ (红色)与 $CD16$ (绿色)共染显示 DCs(橘黄色,箭头所示);B. 咽鼓管扁桃体内 $CD11b^+ MHCII^+$ DCs 的分布, $CD11b$ (红色)与 $MHCII$ (绿色)共染显示 DCs(橘黄色,箭头所示);C. 软腭扁桃体内 $CD11b^+ CD16^+$ DCs 的分布(橘黄色,箭头所示);D. 软腭扁桃体内 $CD11b^+ MHCII^+$ DCs 的分布(橘黄色,箭头所示);DAPI(蓝色)着色细胞核;LP. 固有层;L. 淋巴滤泡;E. 上皮细胞层;比例尺 = $50 \mu m$

A. The distribution of $CD11b^+ CD16^+$ DCs in tubal tonsils, DCs(orange, arrow) were labeled with antibodies against $CD11b$ (red) and $CD16$ (green); B. The distribution of $CD11b^+ MHCII^+$ DCs in tubal tonsils, DCs(orange, arrow) were labeled with antibodies against $CD11b$ (red) and $MHCII$ (green); C. The distribution of $CD11b^+ CD16^+$ DCs(orange, arrow) in soft palate tonsils; D. The distribution of $CD11b^+ MHCII^+$ DCs(orange, arrow) in soft palate tonsils; Cell nuclei were stained with DAPI; LP. Lamina propria; L. Lymphoid follicles; E. Epithelium; Bar = $50 \mu m$

图 1 枯草芽孢杆菌芽孢滴鼻 3 h 后扁桃体中 DCs 的分布

Fig. 1 Distribution of dendritic cells in tonsils after intranasal administration with *Bacillus subtilis* spores



A. 滴鼻 3 h 后咽鼓管扁桃体固有层内 DCs 数量; B. 滴鼻 3 h 后咽鼓管扁桃体淋巴小结内 DCs 数量
A. The numbers of DCs in lamina of tubal tonsil; B. The numbers of DCs in lymphoid follicles of tubal tonsil

图 2 枯草芽孢杆菌芽孢滴鼻后咽鼓管扁桃体中 DCs 数量的变化

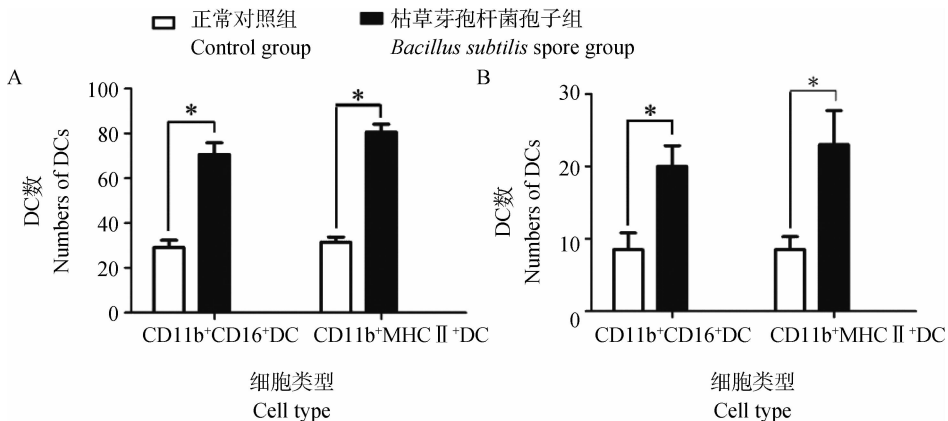
Fig. 2 Changes in number of dendritic cells in tubal tonsils after intranasal administration with *Bacillus subtilis* spores

2.2 枯草芽孢杆菌芽孢对软腭扁桃体树突状细胞数量的影响

正常对照组的黏膜 CD11b⁺ CD16⁺ DCs 和 CD11b⁺ MHCII⁺ DCs 在软腭扁桃体固有层和淋巴小结内散在分布, CD11b⁺ CD16⁺ DCs 和 CD11b⁺ MHCII⁺ DCs 呈黄色或橘黄色, 形态不规则, 数量较少(图 1C、D)。

从图 3A 可见, 应用枯草芽孢杆菌芽孢滴鼻 3 h 后能够显著增加 ($P < 0.05$) 软腭扁桃体固有层内

CD11b⁺ CD16⁺ DCs、CD11b⁺ MHCII⁺ DCs 的数量。CD11b⁺ CD16⁺ DCs 数量增幅为 2.8 倍; CD11b⁺ MHCII⁺ DCs 数量增幅为 3.2 倍。从图 3B 可见, 应用枯草芽孢杆菌芽孢滴鼻 3 h 后能够显著增加 ($P < 0.05$) 软腭扁桃体淋巴小结内 CD11b⁺ CD16⁺ DCs、CD11b⁺ MHCII⁺ DCs 的数量, CD11b⁺ CD16⁺ DCs 数量增幅为 2 倍; CD11b⁺ MHCII⁺ DCs 数量增幅为 2.4 倍。



A. 滴鼻 3 h 后软腭扁桃体固有层内 DCs 数量的变化; B. 滴鼻 3 h 后软腭扁桃体淋巴小结内 DCs 数量的变化
A. The numbers of DCs in lamina of soft palate tonsils; B. The numbers of DCs in lymphoid follicles of soft palate tonsils

图 3 枯草芽孢杆菌芽孢滴鼻后软腭扁桃体中 DCs 数量的变化

Fig. 3 Changes in number of dendritic cells in soft palate tonsils after after intranasal administration with *Bacillus subtilis* spores

3 讨论

树突状细胞是机体功能最强大的抗原递呈细胞

(antigen presenting cell, APC), 也是唯一能激活幼稚型 T 细胞的 APC^[7]。黏膜 DCs 可伸出跨上皮突起摄取抗原, 并将抗原信息传递给 T、B 淋巴细胞,

诱导局部和全身的免疫反应^[8]。DCs 家族的共同特征是表达 CD11c 和 MHCII 分子。猪的呼吸道存在 3 种不同表型的 DCs: CD11b⁺ CD16⁺ DCs、CD16⁺ MHCII⁺ DCs 和 CD11b⁺ MHCII⁺ DCs^[9], 扁桃体内的 DCs 主要为 CD11b⁺ MHCII⁺ DCs 和 CD11b⁺ CD16⁺ DCs, 它们散布在扁桃体固有层和淋巴小结中, 时刻监视病原微生物入侵^[10]。

枯草芽孢杆菌可激活 Toll 样受体 2(TLR2), 是一种良好的免疫佐剂和免疫增强剂^[11]。饲喂枯草芽孢杆菌能提高肠上皮细胞释放细胞因子 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 等, 同时还能增加小肠内 IgA 的表达, 增强局部黏膜对病原微生物的清除能力^[12-13]。芽孢形式的枯草芽孢杆菌免疫活性更好, 且运输和存储都更加便利, 是滋养型枯草芽孢杆菌的良好替代品^[14]。本试验中枯草芽孢杆菌芽孢滴鼻后扁桃体上皮细胞下 DCs 数量增加, 可能是枯草芽孢杆菌芽孢诱导鼻腔上皮细胞(尤其是扁桃体处)分泌一些细胞因子, 后者促使 DCs 在黏膜处聚集。此外, 枯草芽孢杆菌芽孢能够在动物肠道中萌发和繁殖, 甚至还可形成芽孢排出体外^[15-16], 推测在鼻腔中滴入的枯草芽孢杆菌芽孢也可能在鼻腔中进行繁殖, 长期诱导更多的 DCs 迁移到黏膜下, 时刻防御病原微生物的入侵。

正常生理状态下扁桃体淋巴小结内存在许多固有 DCs 和幼稚型的 T、B 淋巴细胞, 是黏膜免疫的诱导位点^[17]。应用抗原可诱导黏膜下的 DCs 表达归巢受体, 迁移至 T、B 淋巴细胞富集的淋巴小结, 进而促使淋巴细胞增殖, 增强局部黏膜免疫力^[18]。例如应用枯草芽孢杆菌配合灭活流感病毒鼻腔免疫小鼠可诱导 DCs 归巢受体 CCR6 和细胞因子 IL-6、IL-10 的表达, 从而激活 Th1/Th2 混合型免疫应答, 提高免疫效果^[19]。本试验枯草芽孢杆菌芽孢滴鼻后, 扁桃体淋巴小结内 DCs 数量显著上升, 表明芽孢型的枯草芽孢杆菌芽孢可能与滋养型枯草芽孢杆菌类似, 也会促进 DCs 表面归巢受体和细胞因子的表达, 进而诱导黏膜下摄取抗原的 DCs 迁移至淋巴小结, 发挥递呈功能。P. E. Makidon 等研究表明, DCs 对抗原的摄取和递呈过程是十分迅速的, 3 h 内即可完成对抗原的摄取和转运^[20]。本试验结果也表明, 应用枯草芽孢杆菌芽孢滴鼻 3 h 即能诱导 DCs 完成对其的摄取, 并回流至淋巴小结, 与 P. E. Makidon 等的研究结果相一致。

MHCII 分子是机体内重要的抗原递呈分子, 它

与 DCs 的成熟密切相关^[21]。未成熟 DCs 表面 MHCII 分子表达量低, 随着 DCs 的成熟, 其抗原递呈能力逐步提升, MHCII 分子表达量也不断上升, 因而 MHCII 分子是评价 DCs 成熟和抗原递呈能力的指标之一^[22]。枯草芽孢杆菌芽孢滴鼻后促进了咽鼓管扁桃体和软腭扁桃体内 DCs 表面 MHCII 分子的表达, 促使 DCs 成熟, 而 DCs 的成熟则会进一步诱导 T、B 淋巴细胞的增殖和分化, 提高细胞免疫水平, 增强局部黏膜免疫力。

综上所述, 枯草芽孢杆菌芽孢滴鼻能促进 DCs 向扁桃体内聚集并诱导 DCs 成熟, 是一种良好的黏膜免疫增强剂。本研究为猪鼻腔免疫奠定了基础。

参考文献 (References):

- [1] 刘志学, 杨倩. 猪扁桃体的解剖学与组织学研究[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(7): 1074-1081.
LIU Z X, YANG Q. Anatomy and histology of pig tonsils[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2009, 40(7): 1074-1081. (in Chinese)
- [2] FEAR V S, BURCHELL J T, LAI S P, et al. Restricted aeroallergen access to airway mucosal dendritic cells *in vivo* limits allergen-specific CD4⁺ T cell proliferation during the induction of inhalation tolerance[J]. *J Immunol*, 2011, 187(9): 4561-4570.
- [3] CHANG S Y, SONG J H, GULENG B, et al. Circulatory antigen processing by mucosal dendritic cells controls CD8⁺ T cell activation[J]. *Immunity*, 2013, 38(1): 153-165.
- [4] ZHAO Y, ZHANG W, XU W, et al. Effects of potential probiotic *Bacillus subtilis* T13 on growth, immunity and disease resistance against vibrio splendidus infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2012, 32(5): 750-755.
- [5] RAJPUT I R, LI L Y, XIN X, et al. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on intestinal ultrastructure modulation and mucosal immunity development mechanism in broiler chickens[J]. *Poult Sci*, 2013, 92(4): 956-965.
- [6] KIM H, HAHN M, GRABOWSKI P, et al. The *Bacillus subtilis* spore coat protein interaction network[J]. *Mol Microbiol*, 2006, 59(2): 487-502.
- [7] CHANG S Y, KO H J, KWEEON M N. Mucosal dendritic cells shape mucosal immunity[J/OL]. *Exp Mol Med*, 2014, 46: e84. [2015-3-23]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3972789/>.

- [8] RUANE D T, LAVELLE E C. The role of CD103⁺ dendritic cells in the intestinal mucosal immune system[J/OL]. *Front Immunol*, 2011, 2: 25. [2015-3-23]. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2011.00025/full>.
- [9] BIMCZOK D, POST A, TSCHERNIG T, et al. Phenotype and distribution of dendritic cells in the porcine small intestinal and tracheal mucosa and their spatial relationship to epithelial cells[J]. *Cell Tissue Res*, 2006, 325(3): 461-468.
- [10] SUHAIL Z, MUSANI M A, AFAQ S, et al. Follicular dendritic cell sarcoma of tonsil[J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2010, 20(1): 55-56.
- [11] CARTMAN S T, LARAGIONE R M, WOODWARD M J. Bacillus subtilis spores germinate in the chicken gastrointestinal tract[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(16): 5254-5258.
- [12] DENG J, LI Y J, ZHANG J H, et al. Co-administration of *Bacillus subtilis* RJGP16 and *Lactobacillus salivarius* B1 strongly enhances the intestinal mucosal immunity of piglets[J]. *Res Vet Sci*, 2013, 94(1): 62-68.
- [13] 李云锋, 邓军, 张锦华, 等. 枯草芽孢杆菌对仔猪小肠局部天然免疫及TLR表达的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2011, 42(4): 562-566.
- LI Y F, DENG J, ZHANG J H, et al. The effects of *Bacillus subtilis* on local innate immune and expression of TLR of pigs[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2011, 42(4): 562-566. (in Chinese)
- [14] ZHANG Y, ZHOU L, ZHANG Y, et al. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores using various combinations of ultraviolet treatment with addition of hydrogen peroxide[J]. *Photochem Photobiol*, 2014, 90(3): 609-614.
- [15] CASULA G, CUTTING S M. Bacillus probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(5): 2344-2352.
- [16] 孙同毅, 张大伟, 邵建新. 枯草杆菌的芽胞在肉鸡肠道中的生活状态和分布[J]. *中国微生态学杂志*, 2009, 21(4): 334-336.
- SUN T Y, ZHANG D W, SHAO J X. Fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in gastrointestinal tract of broiler[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2009, 21(4): 334-336. (in Chinese)
- [17] JAMIN A, GORIN S, CARIOLET R, et al. Classical swine fever virus induces activation of plasmacytoid and conventional dendritic cells in tonsil, blood, and spleen of infected pigs[J]. *Vet Res*, 2008, 39(1): 7.
- [18] MIKHAK Z, STRASSNER J P, LUSTER A D. Lung dendritic cells imprint T cell lung homing and promote lung immunity through the chemokine receptor CCR4[J]. *J Exp Med*, 2013, 210(9): 1855-1869.
- [19] ZANVIT P, TICHOPÁD A, HAVLÍČKOVÁ M, et al. Adjuvant effect of Bacillus firmus on the expression of cytokines and toll-like receptors in mouse nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) after intranasal immunization with inactivated influenza virus type A[J]. *Immunol Lett*, 2010, 134(1): 26-34.
- [20] MAKIDON P E, BELYAKOV I M, BLANCO L P, et al. Nanoemulsion mucosal adjuvant uniquely activates cytokine production by nasal ciliated epithelium and induces dendritic cells trafficking[J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(8): 2073-2086.
- [21] VALHEIM M, HASVOLD H J, STORSET A K, et al. Localisation of CD25⁺ cells and MHCII⁺ cells in lymph nodes draining Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis vaccination granuloma and the presence of a systemic immune response[J]. *Res Vet Sci*, 2002, 73(1): 77-85.
- [22] MALANGA D, BARBA P, HARRIS P E, et al. The active translation of MHCII mRNA during dendritic cells maturation supplies new molecules to the cell surface pool[J]. *Cell Immunol*, 2007, 246(2): 75-80.

(编辑 白永平)