文章编号:1000-5404(2010)06-0541-05

论著

icl mRNA 特异性 10-23DRz 在小鼠体内抗结核分枝杆菌感染的实验研究

李俊明[1],朱道银[2],王 娜[1],罗 清[1],万腊根[1] (330006 南昌,南昌大学第一附属医院检验科[1];400016 重庆,重庆医科大学免疫学教研室[2])

[摘要] **目的** 探讨 icl mRNA 特异性 10-23 脱氧核酶(deoxyribozyme, DRz)对结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis, Mtb)在小鼠体内感染的影响,及其单独或与异烟肼(isoniazidum, INH)联合应用治疗小鼠结核病的效果。**方法** 分别用 DZ4、INH、INH + DZ4-S 或 INH + DZ4 对 Mtb 进行预处理,再用上述经过预处理的 Mtb 感染 BALB/c 小鼠,一定时间后进行小鼠肺组织 Mtb 培养及病理学改变观察。利用 DZ4-FITC 溶液对 BALB/c 小鼠进行滴鼻处理,检测滴鼻途径给药的效果。采用尾静脉注射法建立小鼠结核病模型,将模型小鼠随机分为 5 组($n = 10$),分别给予生理盐水、DZ4、INH、INH + DZ4、INH + DZ4-polyG 治疗,于治疗完成 2 周后进行小鼠肺组织 Mtb 荷菌量检测和病理学改变观察。**结果** Mtb 感染后 2 周,各组小鼠的肺组织荷菌量均无显著性差异($P > 0.05$)。感染进行至 4 ~ 12 周时,INH + DZ4 预处理组 Mtb 感染小鼠的肺组织荷菌量较其它各组均显著偏低($P < 0.05$),肺组织的病理改变较其他各组也明显轻微。经滴鼻途径给予 DZ4-FITC 溶液 4 h 后,小鼠肺组织冰冻切片在荧光显微镜下可见强烈的黄绿色荧光,并至少持续 48 h。对小鼠结核病模型的治疗结果显示,DZ4 单独治疗组小鼠肺组织荷菌量及病理表现与未治疗组无显著差异;加用 INH 治疗的各组小鼠肺组织荷菌量与生理盐水组比较有显著下降($P < 0.05$),肺组织病理表现也明显轻微,但 10-23DRz 和 INH 联合治疗组与 INH 单独治疗组在肺组织荷菌量和病理表现上均无显著性差异。**结论** 10-23DRz 与 INH 联合预处理可有效降低 Mtb 感染小鼠的能力;本研究未发现 10-23DRz 对结核病具有治疗作用或辅助治疗作用。

[关键词] 分枝杆菌,结核;10-23 脱氧核酶;结核病模型,小鼠
[中图法分类号] R-33;R345.5;R520.5 **[文献标志码]** A

10-23 deoxyribozyme targeting icl mRNA inhibits *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice

Li Junming[1], Zhu Daoyin[2], Wang Na[1], Luo Qing[1], Wang Lagen[1] ([1]Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi Province, 330006; [2]Department of Immunology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of 10-23 deoxyribozyme (DRz) targeting the mRNA of isocitrate lyase gene (icl) which play an important role in the persist of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) in host macrophage on the infection of the bacterium and the therapeutic effects of 10-23DRz alone or combined with isoniazidum (INH) on mice tuberculosis. **Methods** According to our previous study, DZ4 (TGAACTGGAAGGCTAGCTACAACGATTGAAGCCC) was identified with the highest cleavage activity among the 10-23 DRz. DZ4-S, with all base pairs of DZ4 but wrong order, DZ4-polyG and DZ4-FITC were synthesized and served as control. Mtb were pretreated with DZ4 (5 μmol/L), or INH (10 μg/L), or INH + DZ4 or INH + DZ4-S, and then used to infect BALB/c mice. The lungs of infected mice were harvested to make Mtb culture at the time of 2, 4, 8 and 12 weeks after the infection. The histopathological changes of lungs were observed at 12 weeks after the infection. DZ4-FITC was used to detect the effects of intranasal administration. BALB/c mice were injected intravenously with Mtb H37Rv strain to make the animal model of tuberculosis. Then the infected mice were treated through intranasal administration with normal saline (50 μl), or INH [5 mg/(kg · d) for 4 weeks], or DZ4 (20 μmol/L, total 50 μl, once per week, for 3 weeks), or INH + DZ4, or INH + DZ4-polyG. Mice were sacrificed in 2 weeks after the end of therapy, and lungs were harvested to quantitate the viable mycobacteria in the lungs and histopathological examination. **Results** The viable Mtb in the lungs of all

[基金项目] 国家自然科学基金(30270584)
[通信作者] 李俊明,电话:(0791)8692785,E-mail: lisir361@163.com

infected mice had no significant difference at 2 weeks after the infection ($P>0.05$). But at 4 to 12 weeks after the infection, the mice infected with Mtb pretreated with INH + DZ4 had significantly minor viable Mtb in their lungs compared with the other groups ($P<0.05$). The pulmonary lesions of INH + DZ4 group were also obviously slighter than other groups. At 4 h after intranasal administration with DZ4-FITC, the frozen section of the lungs emitted bright fluorescence and sustained for at least 48 h. Data from the therapeutic experiment showed that the viable Mtb and histopathological change in the lungs had no obvious difference between DZ4 and normal saline treatment group. So did the INH + DZ4, INH + DZ4-polyG and INH treatment group. **Conclusion** 10-23DRz targeting icl mRNA efficiently resists the infection of Mtb in mice when combined with INH. 10-23DRz has no therapeutic effect on mice tuberculosis and fails to enhance the therapeutic effects of INH in this research.

[Key words] *Mycobacterium tuberculosis*; 10-23 deoxyribozyme; tuberculosis model; mice

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270584). Corresponding author: Li Junming, Tel: 86-791-8692785, E-mail: lisir361@163.com

结核分枝杆菌(mycobacterium tuberculosis, Mtb)感染宿主后可在巨噬细胞内长期存活,维持一种极低代谢水平的持留(persist)状态。研究表明,Mtb 的这种巨噬细胞内持留是导致结核病治疗疗程过长、疗效不佳及治疗后容易复发的重要原因[1,2]。在持留状态下,Mtb 主要通过乙醛酸循环支路代谢脂肪酸获取碳源及能量[3]。异柠檬酸裂合酶(isocitrate lyase, ICL)为乙醛酸代谢途径的关键酶之一,与 Mtb 的细胞内持留直接相关,可能是治疗结核分枝杆菌巨噬细胞内持留的一个极佳靶点[3,4]。在此前的研究中,我们发现利用 icl mRNA 特异性的 10-23 脱氧核酶(deoxyribozyme,DRz)可有效地剪切 icl mRNA,与异烟肼(isoniazidum, INH)联用可有效地抑制 Mtb ICL 的表达,进而抑制 Mtb 在巨噬细胞内的存活[5-7]。为进一步明确 10-23DRz 对 Mtb 在宿主体内感染的影响,以及 10-23DRz 在结核病治疗或辅助结核病化疗中的作用,我们利用小鼠作为感染模型,研究了 10-23DRz 预处理对 Mtb 在小鼠体内感染的影响,以及 10-23DRz 单独或与 INH 联合应用对小鼠结核病的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

SPF 级 BALB/c 小鼠(180 只,雌雄各半,6~8 周龄,体质量 18~22 g)购于重庆医科大学实验动物中心;结核分枝杆菌 H37Rv 购于重庆市肺科医院;10-23DRz 的合成、修饰及标记由上海 Sangon 生物工程公司完成。

1.2 10-23DRz 的设计与合成

根据前期研究结果[5-7],选择 icl mRNA 特异性 10-23DRz 中剪切活性最高的 DZ4(序列:TGAACTGGAAGGCTAGCTACAACGATTGAAGCCC)作为研究对象,以 DZ4-S(序列:TATGAGAGACGCGCAGTACAGATTGAAGCCACTC,其碱基数及组成与 DZ4 完全一致,但碱基排列顺序被随机打乱了)作为对照。在小鼠结核病模型的治疗研究中,另设计了一种末端加有 10 个鸟嘌呤的 10-23DRz:DZ4-polyG 和一种异硫氰酸荧光素标记的 DZ4:DZ4-FITC。

1.3 Mtb 的分组预处理及感染

按如下分组对制备的 Mtb 菌悬液(2×10^6/ml)进行处理:①不处理组;②DZ4 处理组:添加 DZ4 至终浓度为 5 μmol/L;③INH 处理组:添加 INH 至终浓度为 10 μg/L;④INH + DZ4 处理组:同时添加 INH(终浓度 10 μg/L)与 DZ4(终浓度 5 μmol/L);⑤INH + DZ4-S 对照组:同时添加 INH(终浓度 10 μg/L)与 DZ4-S(终浓度 5 μmol/L)。各组 Mtb 在 37 ℃作用 24 h 后用于 BALB/c 小鼠的感染。BALB/c 小鼠按上述 Mtb 的分组随机分为 5 组,分别用上述菌悬液 100 μl 经尾静脉注射感染。

1.4 肺组织 Mtb 的培养与计数

分别于小鼠感染 Mtb 后的 2、4、8、12 周时处死每组小鼠 6 只。取各小鼠的左全肺进行匀浆,将匀浆液倍比稀释后接种改良罗氏培养基,37 ℃培养 3~4 周后进行菌落计数。

1.5 小鼠肺组织的病理变化检测

取感染 12 周小鼠的右肺,经 4% 多聚甲醛固定后行石蜡包埋、切片,HE 染色后观察肺组织的病理学改变。

1.6 10-23DRz 滴鼻途径给药效果的检测

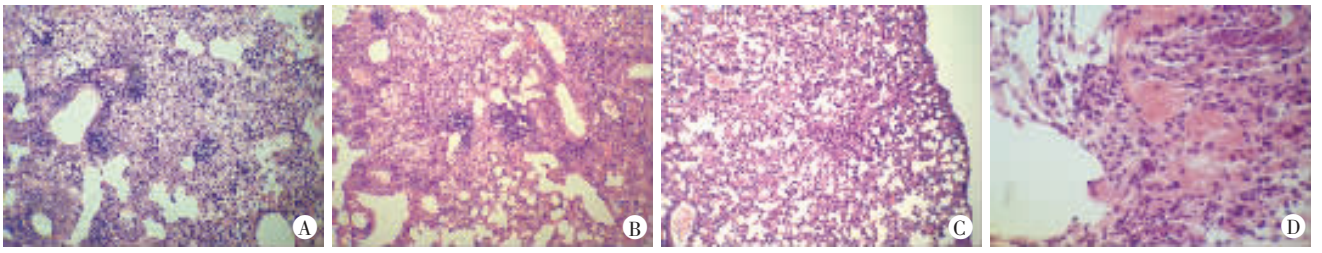
BALB/c 小鼠采用乙醚吸入法麻醉。实验组小鼠麻醉后于鼻腔内滴入 5 μmol/L 的 DZ4-FITC 溶液 50 μl,对照组小鼠于鼻腔内滴入 50 μl 生理盐水。于滴加 DZ4-FITC 溶液后的 4、12、24、48 h 时各处死实验组小鼠 2 只,对照组小鼠于滴加生理盐水 12 h 后处死。小鼠处死后迅速取出肺脏作冰冻切片,荧光显微镜下观察。

1.7 小鼠结核病模型的建立

BALB/c 小鼠结核病模型的建立参照参考文献[8],通过尾静脉注射的方法感染,感染菌液为 2×10^6/ml 的 Mtb H37Rv 菌悬液,每只小鼠 100 μl。对照组小鼠于尾静脉注射生理盐水 100 μl。

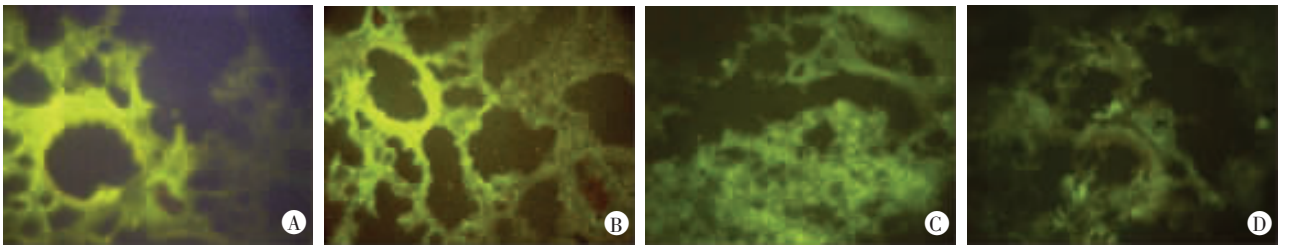
1.8 小鼠结核病模型的治疗及指标检测

1.8.1 实验动物的分组治疗 感染小鼠随机分为 5 组,每组 10 只,按计划时间进行如下处理:① 不治疗组:每只小鼠于鼻内滴加 50 μl 生理盐水;② DZ4 治疗组:20 μmol/L DZ4,50 μl/只,滴鼻给药;③ INH 治疗组:INH 按 5 mg/(kg·d)肌注;同时给予每只小鼠 50 μl 生理盐水滴鼻;④ INH + DZ4 治疗组:INH 治疗同时给予每只小鼠 50 μl 20 μmol/L 的 DZ4 滴鼻;⑤ INH + DZ4-polyG 治疗组:INH 治疗同时给予每只小鼠 50 μl 20 μmol/L 的 DZ4-polyG 滴鼻。



A:未处理组(×100);B:DZ4 处理组(×100); C:INH 处理组 (×100);D:INH + DZ4 处理组(×400)

图 1　不同处理组 Mtb 感染 12 周后小鼠肺组织病理变化　(HE)



A: 4 h;B: 12 h;C:24 h;D:48 h

图 2　DZ4-FITC 滴鼻后不同时间小鼠肺组织病理变化　(荧光显微镜×400)

1.8.2　治疗疗程　　上述治疗于感染 4 周后开始。INH 于治疗 4 周后停药,DZ4 和 DZ4-polyG 按 50 μl/只滴鼻给药,每周 1 次,共 3 次。

1.8.3　指标检测　　治疗结束后 2 周处死各组小鼠,进行肺组织荷菌量和组织病理检测:取小鼠左肺进行组织匀浆后进行 Mtb 的培养与计数。小鼠右肺经 4% 多聚甲醛固定后进行石蜡切片,HE 染色后观察病理改变,抗酸染色后观察肺组织内的细菌生长情况。

1.9　统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料间的比较采用单因素方差分析中的 t 检验,两两比较采用 q 检验。

2　结果

2.1　10-23DRz 预处理对 Mtb 在小鼠体内感染的影响

2.1.1　肺组织 Mtb 培养结果　　小鼠感染 2 周时,各组小鼠肺内的活菌数均无显著性差异($P>0.05$)。感染进行至 4 ~ 12 周时,INH + DZ4 处理组 Mtb 感染的小鼠肺内活菌数较其他各组均明显偏低,与 INH 单独处理组 Mtb 感染小鼠比较下降 0.8 ~ 0.9 log,差异具有显著性意义($P<0.05$)。DZ4、INH + DZ4-S、INH 处理组与未处理组 Mtb 感染小鼠比较均无显著性差异(表 1)。

表 1　各组 Mtb 感染小鼠感染不同时间的肺组织荷菌量

[$\bar{x} \pm s$, $n=6$, 菌落数]

组别	2 周	4 周	8 周	12 周
未处理组	3.80 ± 0.21	4.66 ± 0.30	5.31 ± 0.27	5.46 ± 0.19
DZ4 组	3.84 ± 0.33	4.69 ± 0.27	5.37 ± 0.22	5.51 ± 0.24
INH 组	3.74 ± 0.30	4.61 ± 0.12	5.23 ± 0.16	5.42 ± 0.22
INH + DZ4-S 组	3.79 ± 0.19	4.63 ± 0.16	5.27 ± 0.19	5.43 ± 0.25
INH + DZ4 组	3.73 ± 0.15	3.68 ± 0.24[a]	4.34 ± 0.11[b]	4.59 ± 0.32[b]

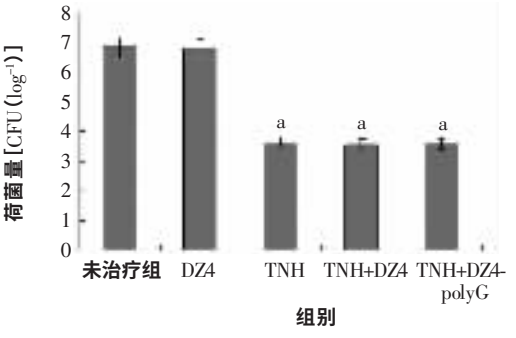
a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与 INH 组比较

2.1.2　肺组织病理表现　　未处理组及 DZ4 处理组 Mtb 感染 12 周后,小鼠肺组织病变严重而广泛,以渗出性改变为主,肺泡内可见大量浆液性渗出,大部分肺泡结构消失,有大量淋巴细胞及单核细胞浸润,类上皮细胞、纤维母细胞等结核结节组成细胞少见。INH 处理组 Mtb 感染小鼠肺组织的病理表现以浆液性渗出改变为主,病变范围较未处理对照组局限,组织充血较轻微。INH + DZ4 处理组 Mtb 感染小鼠的肺组织镜下大部分区域仍见肺泡正常结构,肺组织充血及浆液性渗出轻微,病变区域出现类上皮细胞和纤维母细胞等结核结节组成细胞(图 1)。

2.2　10-23DRz 对小鼠结核病的治疗作用

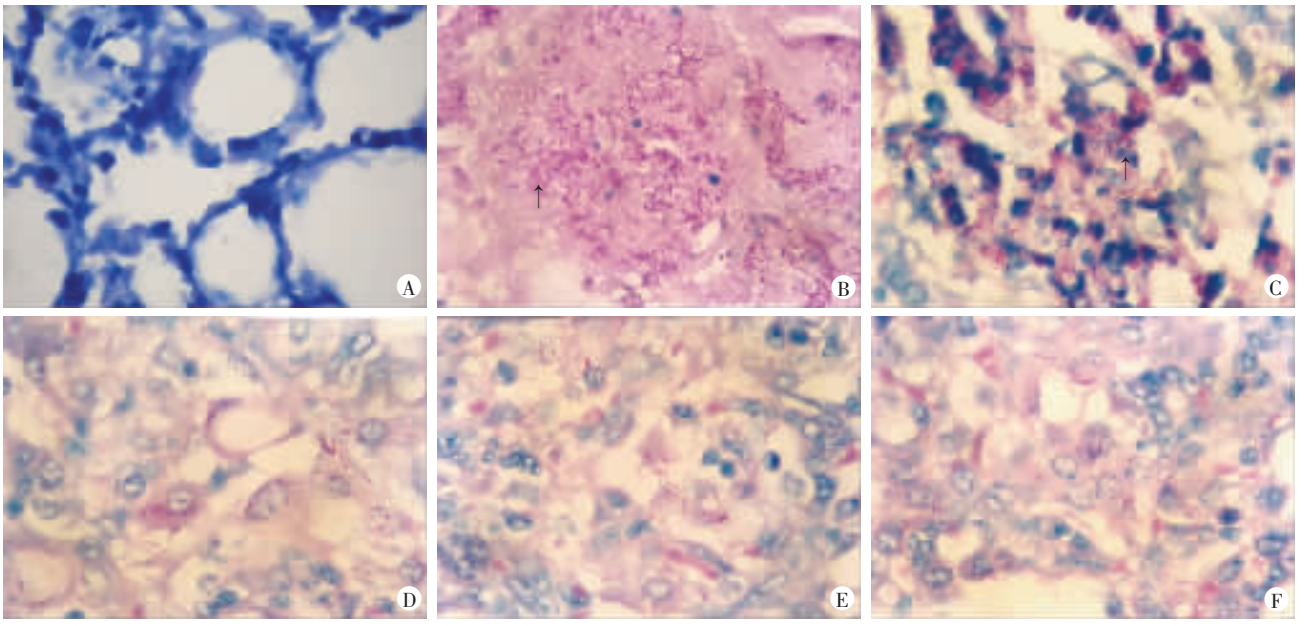
2.2.1　10-23DRz 滴鼻途径给药效果的检测　　经滴鼻途径给予 DZ4-FITC 溶液 4 h 后,小鼠肺组织冰冻切片在荧光显微镜下可见强烈的黄绿色荧光,12 h 后荧光未见明显衰减,24 h 和 48 h 后小鼠肺部荧光有所衰减,但仍可见较强荧光(图 2)。滴加生理盐水的对照组小鼠肺部未见荧光。

2.2.2　小鼠肺组织荷菌量检测　　小鼠肺组织 Mtb 培养结果显示(图 3):DZ4 单独治疗组小鼠肺组织荷菌量与不治疗对照组无显著差别;加用 INH 治疗的各组小鼠肺组织荷菌量与不治疗对照组比较有显著下降($P<0.05$),但 10-23DRz 和 INH 联合治疗组(INH + DZ4、INH + DZ4-polyG)与 INH 单独治疗组间无显著性差异($P>0.05$),未感染小鼠的肺组织未能培养出 Mtb。



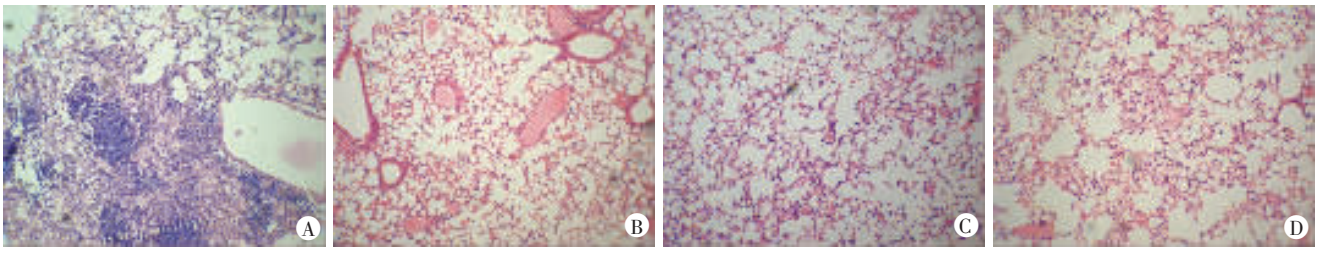
a: $P<0.05$,与未治疗组比较

图 3　结核病小鼠经不同治疗结束后的肺组织荷菌量分析



A:未感染组(×400);B:未治疗组(×1 000);C:DZ4治疗组(×1 000);D:INH治疗组(×1 000);E:INH+DZ4治疗组(×1 000);F:INH+DZ4-polyG治疗组(×1 000);↑:为抗酸染色阳性细菌

图4 结核病小鼠经不同治疗结束后的肺组织病理变化 (抗酸染色)



A:DZ4治疗组;B:INH治疗组;C:INH+DZ4治疗组;D:INH+DZ4-S治疗组

图5 结核病小鼠经不同方法治疗后肺组织病理变化 (HE ×100)

小鼠肺组织抗酸染色结果与Mtb培养结果相似:未感染小鼠肺组织抗酸染色未见有抗酸杆菌;不治疗对照组小鼠肺部抗酸杆菌数目较多,呈簇状或散在分布;DZ4单独治疗组与不治疗对照组小鼠肺部抗酸杆菌数量相似;INH治疗组小鼠肺部抗酸菌数量与不治疗对照组比明显减少,在肺部呈零星散在分布;INH+DZ4、INH+DZ4-polyG组小鼠肺部抗酸菌数量与INH治疗组相似(图4)。

2.2.3 小鼠肺组织病理检测 未治疗组小鼠肺组织病变广泛,病变以渗出性改变为主,肺部可见大量淋巴细胞和单核细胞浸润,肺组织充血实变,肺泡间隔增厚,部分肺泡正常结构消失。DZ4治疗组小鼠肺组织病变与不治疗组相似。INH治疗组小鼠肺泡间隔轻微增厚,部分区域有充血,肺泡结构基本正常。INH+DZ4和INH+DZ4-polyG治疗组小鼠肺部病理改变与INH治疗组相似(图5)。

3 讨论

McKinney等[3]通过动物实验证实敲除icl基因的Mtb在小鼠体内持留的能力大大下降,感染2周(Mtb感染小鼠的前2周为急性期,2周后逐渐进入慢性感染期)后即被进行性清除。在先前的研究中我们针对结核分枝杆菌的icl mRNA设计了特异性的10-23DRz,发现无论是在无细胞体系还是在Mtb内,10-23DRz都可特异、有效地剪切icl mRNA,抑制Mtb ICL的表达。经亚抑菌浓度的INH和10-23DRz联合处理的Mtb在巨噬细胞内的感染力明显下降[5-7]。但由于10-23DRz无法像基因敲除那样完全去除icl基因表达,10-23DRz能否有效降低Mtb在动物体内的感染与持留能力尚不明确,而明确这种作用是将10-23DRz最终用于结核病治疗研究的重要前提。

10-23DRz在感染者体内对Mtb作用的过程影响因素很多,治疗的最终效果是药物与机体多方面因素共同作用的体现。为便于结果分析,在进行正式的治疗实验之前,我们研究了10-23DRz预处理对Mtb在小鼠体内感染的影响,以明确在10-23DRz下调ICL表达的情况下,Mtb在小鼠体内的感染情况。结果显示,当感染进行至4~12周时,INH+DZ4处理组Mtb感染小鼠肺内的活菌数较其它各组均明显偏低,与INH单独处理比较具有显著性差异,说明在急性感染期后,特

异性10-23DRz可有效降低Mtb在小鼠体内的持留能力。这一结果为icl mRNA特异性10-23DRz治疗结核病的研究奠定了理论基础。

ICL主要在Mtb的细胞内持留过程中发挥作用，而目前的抗结核病药物都是针对处于代谢活跃状态下的Mtb起作用，对于处于持留状态下的Mtb效果却十分微弱[9]。已有研究证实，在慢性结核病患者体内往往存在大量的Mtb持留菌，活动性结核病患者或实验动物在化疗药物治疗过程中体内也会有部分Mtb在药物或机体免疫的压力下向持留状态转变[10]。研究表明，正是这些在化疗前存在或在化疗过程中出现的持留Mtb使得结核病化疗的疗程大大地延长[11]，杀灭这部分潜伏菌及阻止代谢活化菌向潜伏态转化有望缩短结核病的治疗疗程。icl mRNA特异性的10-23DRz可能在这一过程中发挥作用，与化疗药物发挥协同和互补作用，提高结核病治疗的效果。因此接下来我们选择小鼠结核病感染模型研究了10-23DRz单独或与INH联合应用治疗小鼠结核病的效果。

Mtb在宿主体内主要寄生于巨噬细胞内，因此10-23DRz首先要进入巨噬细胞才能有效发挥功能。有研究显示，巨噬细胞表面的清道夫受体可与多聚鸟嘌呤(polyG)高效结合，在10-23DRz末端加上10个鸟嘌呤残基不会显著影响10-23DRz对靶RNA的剪切效率[12]。因此，为试图提高10-23DRz进入巨噬细胞的效率，我们设计了一个含10个鸟嘌呤尾巴的10-23DRz(DZ4-polyG)。

在本研究中，我们观察了DZ4、INH、INH与DZ4合用、INH与DZ4-polyG合用情况下对小鼠结核病的治疗效果。结果发现与未治疗对照组比较，DZ4单独治疗组小鼠肺组织荷菌量及病理改变无显著差别，10-23DRz和INH联合治疗组(INH + DZ4、INH + DZ4-polyG)与INH单独治疗组间也无显著性差异。因此本研究未能观察到10-23DRz对INH治疗有协同或促进作用。

一定的药物剂量对于10-23DRz发挥作用是必需的[13]。我们分析认为，本实验出现阴性结果的原因之一可能在于药物剂量不够。虽然我们所用10-23DRz溶液浓度较高(20 μmol/L)，但一方面，由于小鼠经滴鼻途径给药时药物超过100 μl时小鼠很难全部吸入(我们所加10-23DRz的量为50 μl)，而很少量的药物可能会被鼻腔、气管和肺泡内的分泌液或组织液发生较显著的稀释，导致药物浓度过低而不能正常发挥功效。另一方面，Mtb在宿主体内主要存在于巨噬细胞内，10-23DRz要先进入巨噬细胞，再穿透Mtb细胞壁才能发挥功能，这进一步降低了到达Mtb内的10-23DRz的量。另外，动物体内存在大量的核酸酶，可使10-23DRz的半衰期较体外应用时明显缩短，这也可能是影响10-23DRz在体内发挥功效的原因之一。

由于icl mRNA特异性10-23DRz只特异性针对持留状态下的少量Mtb起作用，我们推测本研究没有观察到10-23DRz治疗效果的另一原因可能在于10-23DRz所致的荷菌量的变化在早期可被INH的作用所掩盖。鉴于以上分析，我们认为：50 μl 20 μmol/L的10-23DRz经滴鼻途径给药对INH治疗结核病的效果不具有辅助作用；但在其他使用浓度及检测条件下的效果有待进一步研究。由于持留状态下的Mtb在宿主机体免疫力低下时具备活化的潜能，我们推测icl mRNA特异性10-23DRz可能在防止结核病的复发中可发挥一定作用。在下一步的研究中，我们计划在INH与10-23DRz联合治疗结束一段时间后，用免疫抑制剂如肾上腺皮质素处理动物，诱导体内持留菌的活化，观察各治疗组动物的复发情况。

参考文献：

[1] Nuermberger E, Bishai W R, Grosset J H. Latent tuberculosis infection[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2004, 25(3): 317-336.
[2] 曾正国. 现代实用结核病学[M]. 北京：科学技术文献出版社，2003：259-260.
[3] McKinney J D, Honer-zu-Bentrup K, Munoz-Elias E J, *et al*. Persistence of Mycobacterium tuberculosis in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase[J]. Nature, 2000, 406(6797): 735-738.
[4] Helmuth L, Microbiology. A weak link in TB bacterium is found[J]. Science, 2000, 289(5482): 1123-1125.
[5] 李俊明，李娜，朱道银，等. 10-23脱氧核酶对结核分枝杆菌异柠檬酸裂合酶表达的影响及其抗菌作用[J]. 中华结核和呼吸杂志，2006，29(8)：531-535.
[6] 李俊明，朱道银，伊正君，等. 结核分枝杆菌ICL mRNA特异性10-23脱氧核酶切割活性的鉴定及其切割特点[J]. 中国生物化学与分子生物学报，2006，22(2)：151-157.
[7] Li J, Zhu D, Yi Z, *et al*. DNAzymes targeting icl gene inhibit ICL expression, decrease Mycobacterium tuberculosis survival in macrophages [J]. Oligonucleotides, 2005, 15(3): 215-222.
[8] 江山，朱道银，骆旭东，等. 结核分枝杆菌DNA疫苗对小鼠结核病免疫治疗作用的实验研究[J]. 中华结核和呼吸杂志，2005，28(5)：305-309.
[9] Parrish N M, Dick J D, Bishai W R. Mechanisms of latency in Mycobacterium tuberculosis[J]. Trends Microbiol, 1998, 6(3): 107-112.
[10] Mitchison D A. Treatment of tuberculosis. The mitchell lecture 1979 [J]. J R Coll Physicians Lond, 1980, 14(2): 91-95, 98-99.
[11] Fraser A, Paul M, Attamna A, *et al*. Treatment of latent tuberculosis in persons at risk for multidrug-resistant tuberculosis: systematic review[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2006, 10(1): 19-23.
[12] Wu Y, YU L, McMahon R, *et al*. Inhibition of bcr-abl oncogene expression by novel deoxyribozymes (DNAzymes) [J]. 1999, 10: 2848-2857.
[13] Isaka Y. DNAzymes as potential therapeutic molecules[J]. Curr Opin Mol Ther, 2007, 9(2): 132-136.

(**收稿**：2009-08-20；**修回**：2009-11-08)
(编辑 邓强庭)