维普资讯 http://www.cqvip.com

综 述 文章编号:0253-3626(2007)06-0664-03

幽门螺杆菌尿素通道蛋白研究进展

杨丽娟 综述,姜 政 审校

(重庆医科大学附属第一医院消化内科,重庆 400016)

【中国图书分类法分类号】R378;R341 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-11-10

幽门螺杆菌是人类最常见的致病菌,我国普通人群的感染率为 50%~80%, 而且仍以每年 1%~2%的速度增加。H. pylori 感染与人 B 型胃炎和消化性溃疡的发生有密切关系、同时与 MALT 淋巴瘤和胃癌以及胃肠外疾病也有重要的关系。实验证明 H.pylori 能够导致蒙古沙鼠胃癌的发生,故已被世界卫生组织国际癌症研究机构列入第一类致癌原[1]。抗生素在 H. pylori 根除及其相关疾病治疗方面取得了较大进展,但其毒副作用明显、疗效不稳定,同时耐药菌株的产生以及难以解决 H.pylori 复发等问题, 已成为临床上治疗 H.pylori 相关性疾病的几大障碍。因此对 H.pylori 感染的诊断及其治疗显得十分必要,特别是 H.pylori 疫苗的研究开发尤为重要,因此就 H.pylori UreI 的研究进展作一综述。

1 H.pylori UreI 结构特征及功能

1.1 H.pylori UreI 结构特征

H.pylori 是嗜中性,微需氧性革兰氏阴性杆菌,其大小约为 0.5~3μm, 为了在胃环境中能够成活,H. pylori 进行了一系列的抗酸、耐酸机制的进化过程。其最大特征是能产生大量高活性的尿素酶,将尿素降解为氨和二氧化碳,氨中和胃酸。尿素酶基因是所有 H. pylori 菌株共同拥有的,编码的蛋白占细菌总量的 6%,其基因大小约为 7.5 kb,共有 9 个读码框(ORF),其基因编码区包括两个基因簇,一个编码 UreAB,另一个编码 UreIEFGH, 其中 UreAB 为尿素酶的两个结构亚单位,是其活性部分,而 UreIEFGH 的作用是将镍离子传递至尿素酶活性位点[2],其中 ureH、和 ureI 为 H.pylori 所特有。UreI 是 H.pylori 的内膜蛋白, 也就是 H. pylori 尿素通道蛋白,序列分析 ureI 基因为 588bp,编码 21600 的膜蛋白,有 6 个跨膜螺旋序列,缺少信号肽。在酸性 pH 条件下,4 个保守的组氨酸残基(H71、H123、H131 和 H193)以及胞内环保守区域对氨的生成起到决定性的作用, 发生上述基因点突变,则导致 UreI 通道的失活, 同时发现第 3 个胞内环(L165、G166、K167 和 F168)对 UreI 通道的开放至关重要;研究还发现 UreI 的 H123、H131、Asp129、Asp140、Glu138 和在第二胞内环 Lys132 以及 C 末段的 H193 在尿素的转运过程中也至关重要,一旦发生基因的突变,则大大地影响 UreI 通道转运尿素的活性[3]。

1.2 H.pylori UreI 功能

实验发现, 尽管都是尿素酶通道,S.salivarius 的 UreI 在中性和酸性 pH 时同样开放,而 H.pylori 和 H. hepaticus 则只在酸性时才激活,如果 H.pylori 的 UreI 第一胞内环 70、71 位组氨酸残基被谷氨酸残基或 S.salivarius 的同源第一胞内环所取代,则 UreI 通道活性在中性时也保持部分或完全开发,提示组氨酸残基质子化 / 脱质子化改变此环的构型,进而改变了 UreI 的开闭状态; 第二胞内环有两个组氨酸残基和一些羧酸盐,如果发生变异,特别是两个组氨酸残基,则导致尿素的转运丧失,提示其可能在 H.pylori 的 UreI 通道活性中是必须的。综上所述,第一胞内环与 UreI 在酸性和中性 pH 时的开 / 闭有关,而第二胞内环 C 末段需要质子化氨酸残基实现 H.pylori 的酸控通道功能。在 UreI 存在的情况下,尿素的通透性提高 300 倍左右,因此 UreI 在 H.pylori 胃内定植及其致病机制中起着重要的作用。据 Sebbane 研究,UreA/B 与 UreI 相互作用形成的膜复合体有利于尿素酶的脱辅基酶蛋白在细菌的膜表面进行组装,同时迅速地允许尿素通过细胞膜而进入菌体,被胞质内的尿素酶分解,中和胃酸,使胞质内 pH 上升,有利于 H.pylori 的生存[4]。

总之,H.pylori 的急性抗酸机制依赖于 UreI 的表达,有 6 个跨膜螺旋序列编码的跨膜蛋白是一酸控尿素通道,在 pH6.5 和 5.5 之间开发,pH6.2 时达活性半峰值。相对于其它嗜中性细菌来说,由于具有高等电点,质子进入外膜受限。当周质的 pH 降至 6.5 以下时,尿素通道通过改变构型而开发,胞质中 NH_3 产生,NH_3 弥散出内膜并提升周质的 pH, 当 pH 升高到 6.0 以上时,通道的活性减弱,从而在不需要尿素酶时抑制尿素酶的活性。而慢性抗酸机制涉及到 Ni^{2+} 转运以及插入脱辅基酶蛋白从而生成成倍的尿素酶,

2 H.pylori UreI 致病的机理

大量的研究证明,H.pylori 最适合在中性的条件下生长,而并非嗜酸性细菌,但 H.pylori 却在酸性环境下生长并致病,这引起了大家的广泛兴趣。众所周知,H.pylori 的尿素酶在其抗酸过程中发挥了重要的作用, 而 UreI 在 H. pylori 致病中

作者介绍: 杨丽娟(1980-),女,硕士研究生,住院医师,
主要研究方向:H.pylori 与胃肠疾病的研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

的起到了最关键的作用:(1)有助于 H.pylori 在胃内的定植[5],早期研究表明,H.pylori 表面存在的尿素酶对于 H.pylori 在胃内定植起到了一定的作用,它分解尿素从而在细菌表面产生一层氨云,中和周围的胃酸,而细菌胞质内的尿素酶对于 H.pylori 在胃内定植认为几乎没有什么作用,然而进一步研究表明,当 pH 低于 4.5 时,细菌表面的尿素酶逐渐失去活性,而当 pH 低于 4 时,就不可逆转地失去其活性,因此可以推测细菌表面的尿素酶对于 H.pylori 在胃内定植所起到的作用并不象以前人们所认识的那样,相反胞质内的尿素酶在 H.pylori 整个定植过程中起到了至关重要的作用。在中性 pH 时,完整 H.pylori 胞质内的尿素酶活性较低,而当 pH6.5 以下时,尿素酶的活性逐渐增强,当 pH 到 5.5 时达最高直到 pH2.0,随着 pH 的下降,尿素酶活性可增加 20 倍左右。但是胃内的尿素浓度一般在 1~3mmol/L 之间,尿素渗入脂质双层的速度是 4×10^{6}cm/s,这一速度不足以使细菌内部的尿素酶达到饱和状态,胃内的尿素是如何迅速地进入胞内而发挥作用。近年来,随着细菌内膜上尿素通道蛋白的发现,人们很好地解释了上述情况。尿素通道蛋白实际上就是 H. pylori UreI,该通道为 pH 值依赖性通道,当 pH<6.2 时,细菌表面的尿素酶逐渐失去活性,而此时的 UreI 通道逐渐开发,能够选择地使尿素通过,进入胞质中的尿素被尿素酶水解成 CO_2 和 NH_3,NH_3 迅速扩散至胞外,从而发挥中和胃酸的作用,弥补了细菌表面的尿素酶逐渐失去活性对 H.pylori 所带来的不利影响。说明 UreI 不仅对 H.pylori 通过胃液是必要的,而且对于在胃上皮表面生长繁殖的 H.pylori 也是必不可少的。Mollenhauer 等用野生型 H.pylori 感染蒙古沙鼠,对感染的反应以及胃内 pH 都模拟 H.pylori 感染人类的情况,在抑制胃酸的分泌后,野生型以及 ureI 基因敲出的 H.pylori 能够定植在胃窦,而 ureI 基因缺失的突变体则不能定植,如果继续抑制胃酸的分泌,则 ureI 基因缺失的突变体也能够定植在胃窦内,恢复胃酸分泌后又将导致 ureI 突变体的 H. pylori 根除,说明 UreI 在 H.pylori 胃内转运以及定植在胃上皮细胞起着不可忽视的作用[6];Bury 进一步研究和阐述了 H.pylori UreI的致病作用,在酸性环境下,氨的生成与 UreI 密切相关,而氨的生成是 H.pylori 对抗胃酸、耐受胃酸以及在胃内定植的基础,同时指出 UreI 是 H.pylori 在胃内定植最关键的一个环节[7]。在酸性 pH 中,只要尿素浓度在 1mmol/L 的情况下,UreI 能够迅速的转运尿素,而尿素在尿素酶的作用下产生氨,从而迅速地缓冲酸性环境,使 pH 达到 6.0 以上,因此这就是 H.pylori 能够在 pH<4.0 条件下生成的重要原因[8,9];体外实验发现酸性培养基有利于触发胞质中的尿素酶的活性,缺失 ureI 基因则阻止了尿素酶的激活,从而使 H.pylori 失去了对抗胃酸、耐受胃酸的特性,也就失去了在胃内定殖、生存的基础[10,11]。②有利于 CagA 从细菌胞质中央向周围转移,而后释放在胃上皮细胞之间,引起上皮细胞的变性、坏死等炎症反应[12,13]。CagA 基因也称为细胞毒素相关基因,其表达产物为 CagA 蛋白,后者为 120~128ku 高分子的蛋白,是 Hp 产生的另一重要毒力因子,具有 CagA 基因的 Hp 几乎都表达 CagA 蛋白并产生可测的抗体反应。据文献报道,CagA 阳性菌株能够直接或间接(通过 NF-κB)诱导胃上皮细胞 IL-8 的分泌,而 IL-8 在中性粒细胞趋化和激活过程中起重要作用,导致胃粘膜的损伤。动物实验发现,CagA 基因和 CagA 蛋白与胃炎、消化性溃疡、尤其胃癌的发生有良好的相关性。与此同时胞浆中其它成分如尿素酶也存在胞内运输,以适应外在环境的变化;③有助于将 Ni^{2+} 转运并插入脱辅基酶蛋白而生成尿素酶,Sachs 等研究 H.pylori 适应酸微环境的机制,归纳为以下 time-independent、acute 和 chronic responses 三个方面,其中快慢反应都涉及到 UreI 蛋白通道,快反应与尿素的转运有关,而慢反应涉及到 Ni^{2+} 转运以及插入脱辅基酶蛋白从而生成成倍的尿素酶,有利于通过胃酸而定植在胃上皮细胞[13]。以上研究成果不仅揭示了 UreI 蛋白在 H.pylori 致病机制中所起的关键的作用,同时对开发 H.pylori 疫苗也具有重要的指导意义,特别对疫苗有效抗原的筛选指明了方向。

3 H.pylori UreI 在临床上的应用前景

3.1 H.pylori UreI 疫苗的理论基础 为什么自然感染 H.pylori 之后,引起免疫应答导致机体的损害,而 H.pylori 疫苗则能清除已有的 H.pylori 感染,免疫动物能使动物获得免疫保护力[14-16]? 关于保护性免疫机制的研究是目前世界上 H.pylori 研究的热点也是研究的一个难点。据初步研究,这主要是由于 T 淋巴细胞(不同亚群)在 H.pylori 感染与 H.pylori 疫苗中的种类和作用不同所致。已有实验证明,H.pylori 感染小鼠和人类,Th_1 细胞被抑制,而 H.pylori 疫苗产生的保护性免疫则与 Th_1 细胞抑制,Th_2 细胞活化密切相关——选择性诱导抗原特异性 Th_2 细胞应答,促进上皮内淋巴细胞的有丝分裂和 B 细胞种型的分化。最近有实验报道,Th_1 型免疫反应也参与了免疫保护机制,Th_1 和 Th_2 的平衡协调可能对疫苗的保护机制更为重要。尽管如此,自然感染不但不能产生有效的保护性免疫—完全清除感染的状态,而且对机体产生损害。这种持续的感染状态常常存在几年,甚至伴随终身。据研究 H.pylori 持续感染状态与 H.pylori UreI 有重要的关系,抑制 ureI 的表达,从而抑制尿素跨膜转运,使 H.pylori 对酸不耐受,进而不能在胃内强酸环境中定居,达到根除 H.pylori 及其相关性疾病的目的。实验已证明 ureI 基因缺失突变的 H.pylori 在强力抑制胃酸的分泌的情况下,则能够定植在胃窦内,如果恢复胃酸的分泌后则将导致 ureI 基因突变的 H.pylori 根除[6],因此若能应用基因重组技术将 H.pylori UreI 基因克隆到表达载体中,再转染表达菌,使其表达具有活性的能够分泌到细胞外 UreI,此时机体的抗原提呈细胞 (Antigen presenting cell,APC)捕获具有治疗作用的抗原 UreI,经其加工处理后将 Ag 信息传递给 T、B 淋巴细胞,从而引发一系列特异性免疫应答,同时还活化树突状细胞 (Dendritic cells,DC)。近年来研究表明,DC 是外来抗原与机体免疫系统之间

维普资讯 http://www.cqvip.com

的桥梁,是机体内最有效的、功能最强大的专职 APC,具有活化幼稚 T 细胞的能力,能合成大量的 MHC II 以及摄取和转运 Ag 的特殊膜受体,是体内 Ag 的主要摄取者和 T 细胞激活的主要承担者,不仅能够以抗原特异性的方式启动 T 细胞识别和杀伤微生物,而且还可以激发免疫记忆保护,当宿主再次受到微生物的攻击时发挥保护作用。综上所述,以 UreI 为抗原的 H.pylori 疫苗将具有广阔的应用前景。

3.2 H.pylori UreI 疫苗载体的选择

疫苗的治疗是否有效除了选择有效的治疗基因外,还取决于:必须有一定量表达外源基因的载体达到体内;载体在体内微环境中能有效地表达外源基因;通过一定的机制对载体表达的时序及表达量进行调控,而以 BCG 牛型结核分枝杆菌的减毒菌株作为载体,则具有上述的特点,同时与其它载体相比 BCG 更具有优越性。BCG 以往主要用于预防结核菌的感染,已广泛应用了 60 余年,全世界接种人数超过 30 亿人次,而未发现明显的毒副作用。它能在巨噬细胞中持续、稳定的表达,由于是活载体及其独特的安全性和免疫佐剂作用而受到科学家们的关注,经过分子生物学改造以后,已构建出能在 BCG 中表达外源基因的大肠杆菌 - 分枝杆菌穿梭表达质粒。研究表明重组 BCG(rBCG)表达的 IL-12、IFN-γ、GM-CSF、HCG-β 能被机体识别,可用于人类的生物治疗。因此重组 BCG 技术已经作为一种分子生物学技术广泛用于疫苗、肿瘤、治疗等领域[17-20]。

如果以 BCG 作为载体,选择 H.pylori UreI 编码基因为目的基因进行 PCR 扩增,将其插入大肠杆菌 - 分枝杆菌穿梭表达质粒 pBCG 中,并导入 BCG 中表达,可使机体长期的产生细胞免疫和体液免疫,因而该疫苗将是一种理想的、高效的、特异的疫苗,它将预防和治疗于一体,如果外源基因在 BCG 中过度表达,还可以通过体外干预的方法终止其过度表达。

3.3 H.pylori 疫苗的前景

虽然 H.pylori 疫苗的研究取得了显著的进展,预计将有商品化的 H.pylori 疫苗进入临床实验,但是 H. pylori 疫苗成功地应用于人类预防和临床治疗尚有许多困难有待解决,同时尚有许多工作有待深入:①进一步需要阐明人体感染 H. pylori 后的免疫应答和疫苗免疫保护机制,为疫苗地设计及免疫策略进一步提供依据;②进一步筛选更为有效的抗原以及筛选更加完善的疫苗佐剂,使机体产生更为有效细胞免疫和体液免疫;③研制更安全有效的疫苗运载释放系统及有效的免疫接种方案;④建立更能客观评价疫苗免疫效果的动物模型等,因此 H.pylori 疫苗应用于人类将是一项艰巨的任务。

(通讯作者:姜 政 重庆医科大学附属第一医院消化科 重庆,400016;电话:13500328655,E-mail:jiangz1753@163.com)

参 考 文 献

[1] Honda S,Fujioka T,Tokieda M,et al. Development of Helicobacter pylori-induced gastric carcinoma in Mongolian Gerbils[J]. Cancer Res, 1998;58:4255-4259.

[2] Park JU,Song JY,Kwon YC,et al. Effect of the urease accessory genes on activation of the Helicobacter pylori urease apoprotein [J]. Mol Cells,2005;20(3):371-377.

[3] Weeks DL,Sachs G.Sites of pH regulation of the urea channel of Helicobacter pylori[J].Mol Microbiol,2001;40(6):1249-1259.

[4] Sebbane F,Bury-Mone S,Cailliau K,et al.The Yersinia pseudotuberculosis Yut protein,a new type of urea transporter homologous to eukaryotic channels and functionally interchangeable in vitro with the Helicobacter pylori UreI protein[J].Mol Microbiol,2002;45(4):1165-1174.

[5] Gueneau P,Loiseaux-De Goer S.Helicobacter: molecular phylogeny and the origin of gastric colonization in the genus[J].Infect Genet Evol,2002;1(3):215-223.

[6] Mollenhauer-Rektorschek M,Hanauer G,Sachs G,et al. Expression of UreI is required for intragastric transit and colonization of gerbil gastric mucosa by Helicobacter pylori[J].Res Microbiol,2002;153(10):659-666.

[7] Bury-Mone S,Skouloubris S,Labigne A,et al. UreI:a Helicobacter pylori protein essential for resistance to acidity and for the early steps of murine gastric mucosa infection[J].Gastroenterol Clin Biol,2001;25(6-7):659-663.

[8] Sachs G,Shin JM,Munson K,et al.Review article:the control of gastric acid and Helicobacter pylori eradication[J].Aliment Pharmacol Ther,2000;14(11):1383-1401.

[9] Rektorschek M,Buhmann A,Weeks D,et al.Acid resistance of Helicobacter pylori depends on the UreI membrane protein and an inner membrane proton barrier[J].Mol Microbiol,2000;36(1):141-512.

[10] Scott DR,Marcus EA,Weeks DL,et al.Expression of the Helicobacter pylori ureI gene is required for acidic pH activation of cytoplasmic urease[J].Infect Immun,2000;68(2):470-477.

[11] Athmann C,Zeng N,Kang T,et al.Local pH elevation mediated by the intrabacterial urease of Helicobacter pylori cocultured with gastric cells[J].J Clin Invest,2000;106(3):339-347.

[12] Hong W,Sano K,Morimatsu S,et al. Medium pH-dependent redistribution of the urease of Helicobacter pylori[J].J Med Microbiol, 2003;52(Pt 3):211-216.

[13] Wu H,Nakano T,Daikoku E,et al.Intrabacterial proton-dependent CagA transport system in Helicobacter pylori[J].J Med Microbiol, 2005;54(Pt 12):1117-1125.

[14] Velin D,Michetti P.Immunology of Helicobacter pylori Infection [J]. Digestion,2006;73(2-3):116-123.

[15] Taylor JM,Ziman ME,Huff JL,et al.Helicobacter pylori lipopolysaccharide promotes a Th1 type immune response in immunized mice[J].Vaccine,2006;24(23):4987-4994.

[16] Hatzifoti C,Roussel Y,Harris AG,et al.Mucosal immunization with a urease B DNA vaccine induces innate and cellular immune re sponses against Helicobacter pylori [J].Helicobacter,2006;11 (2): 113-122.

(下转第 669 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

结合及转活效能,但具体亚型的生物学重要性都不明确。其与靶基因启动子序列的结合很复杂,意味着靶基因的激活充满了复杂性和多样性。同时关于 pax7 作用的传统观点也在不断接受挑战。今后的研究重点将集中于 pax7 在肌肉形成中的作用及其机制以及其与生肌性干细胞的相关作用方面,因为这意味着可以利用 pax7 使干细胞向生肌性细胞转变,这是一种旨在显著增强肌肉再生的肌肉疾病治疗策略。

参 考 文 献

[1] Balczarek KA,Lai ZC,Kumar S.Evolution of functional diversification of the paired box(Pax)DNA-binding domains[J].Mol Biol Evol,1997;14(8):829-842.

[2] Barr FG,Fitzgerald JC,Ginsberg JP,et al.Predominant expression of alternative PAX3 and PAX7 forms in myogenic and neural tumor cell lines[J].Cancer Res,1999;59(21):5443-5448.

[3] Ziman MR,Thomas M,Jacobsen P,et al.A key role for pax7 transcripts in determination of muscle and nerve cells[J].Exp Cell Res,2001;268(2):220-229.

[4] Mishra R,Gorlov IP,Chao LY,et al.PAX6,paired domain influences sequence recognition by the homeodomain[J].J Biol Chem,2002;277(51):49488-49494.

[5] Cho EA,Prindle MJ,Dressler GR. BRCT domaincontaining protein PTIP is essential for progression through mitosis[J].Mol Cell Biol,2003;23(5):1666-1673.

[6] Seale P,Sabourin LA,Girgis-Gabardo A,et al.pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells[J].Cell,2000;102(6):777-786.

[7] Oustanina S,Hause G,Braun T.pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification[J].EMBO J,2004;23(16):3430-3439.

[8] Kuang S,Charge SB,Seale P,et al.Distinct roles for pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis[J].J Cell Biol,2006;172(1):103-113.

[9] Relaix F,Montarras D,Zaffran S,et al.Pax3 and pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells[J].J Cell Biol,2006;172(1):91-102.

[10] Chen Y,Lin G,Slack JM.Control of muscle regeneration in the Xenopus tadpole tail by pax7[J].Development,2006;133(12):2303-2313.

[11] Horst D,Ustanina S,Sergi C,et al.Comparative expression analysis of Pax3 and pax7 during mouse myogenesis[J].Int J Dev Biol,2006;50(1):47-54.

[12] Buckingham M,Bajard L,Chang T,et al.The formation of skeletal muscle:from somite to limb[J].J Anat,2003;202(1):59-68.

[13] Zammit PS,Heslop L,Hudon V,et al.Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fibers[J].Exp Cell Res,2002;281(1):39-49.

[14] Nagata Y,Kobayashi H,Umeda M,et al.Sphingomyelin levels in the plasma membrane correlate with the activation state of muscle satellite cells[J].J Histochem Cytochem,2006;54(4):375-384.

[15] Hartigan-O'Connor D,Chamberlain JS.Developments in gene therapy for muscular dystrophy[J].Microsc Res Tech, 2000;48(3-4):223-238.

[16] Zammit PS,Relaix F,Nagata Y,et al.pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells[J].J Cell Sci,2006;119(Pt 9):1824-1832.

[17] Tajbakhsh S.Stem cells to tissue:molecular,cellular and anatomical heterogeneity in skeletal muscle[J].Curr Opin Genet Dev,2003;13(4):413-422.

[18] Charge SB,Rudnicki MA.Cellular and molecular regulation of muscle regeneration[J].Physiol Rev,2004;84(1):209-238.

[19] Seale P,Rudnicki MA.A new look at the origin,function,and "stem-cell"status of muscle satellite cells[J].Dev Biol,2000;218(2):115-124.

[20] Schmalbruch H,Lewis DM. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles[J].Muscle Nerve,2000;23(4):617-626.

[21] Zhao P,Hoffman EP.Embryonic myogenesis pathways in muscle regeneration[J].Dev Dyn,2004;229(2):380-392.

[22] Musaro A,Giacinti C,Borsellino G,et al.Stem cell-mediated muscle regeneration is enhanced by local isoform of insulin-like growth factor 1[J].Proc Natl Acad Sci USA, 2004;101(5):1206-1210.

[23] Relaix F,Rocancourt D,Mansouri A,et al.A Pax3/pax7- dependent population of skeletal muscle progenitor cells[J].Nature,2005;435(7044):948-953.

[24] Kuang S,Charge SB,Seale P,et al.Distinct roles for pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis[J].J Cell Biol,2006;172(1):103-113.

(上接第 666 页)

[17] Mederle I,Bourguin I,Ensergueix D,et al.Plasmidic versus insertional cloning of heterologous genes in Mycobacterium bovis BCG:impact on in vivo antigen persistence and immune responses[J].Infect Immun,2002;70:303-314.

[18] Lee CF,Chang SY,Hsieh DS,et al.Treatment of bladder carcinomas using recombinant BCG DNA vaccines and electroporative gene immunotherapy[J].Cancer Gene Ther,2004;11(3):194-207.

[19] Arnold J,De Boer EC,O'Donnell MA,et al.Immunotherapy of Experimental Bladder Cancer with Recombinant BCG Expressing Interferon-gamma[J].J Immunother,2004;27(2):116-123.