

·基础研究·

结核分枝杆菌融合蛋白 Ag85B-Hsp16.3、Ag85B-ESAT6 和分泌蛋白 Hsp16.3 体外对人肝癌细胞 HepG-2 的作用 *

杨 巍¹ 师长宏^{2△} 张彩勤² 赵 勇² 赵善民² 赵佐庆^{1△}

(1 第四军医大学唐都医院实验外科 陕西 西安 710038 2 第四军医大学实验动物中心 陕西 西安 710032)

摘要 目的：探讨结核分枝杆菌融合蛋白 Ag85B-Hsp16.3、Ag85B-ESAT6 及分泌蛋白 Hsp16.3 对人肝癌细胞 HepG-2 的作用。**方法：**将已构建的含 3 种目的基因的表达载体 pProEXHTa-Ag85B-Hsp16.3、pProEXHTa-Ag85B-ESAT6 和 pProEXHTb-Hsp16.3，分别转入宿主菌 *E.coli* DH5 α 中，诱导表达后分别获得 Ag85B-Hsp16.3、Ag85B-ESAT6 和 Hsp16.3 三种蛋白，采用 Ni²⁺ 亲和层析柱进行纯化，并用透析方法进行目的蛋白的复性。复性的蛋白按照不同浓度和作用时间分别与肝癌细胞 HepG-2 反应，用 MTT 法检测细胞生长情况。**结果：**三种蛋白被成功纯化并复性。MTT 数据统计分析显示，终浓度 10 μ g/ml 的三种蛋白对 HepG-2 细胞生长没有明显作用，当三种蛋白的终浓度分别为 20、40、80 μ g/ml 时均能够抑制 HepG-2 细胞的生长，并且抑制作用随着蛋白终浓度的增大以及作用时间的延长而增强。不同类别的蛋白抑制作用没有明显差别。**结论：**结核分枝杆菌的部分分泌蛋白能够抑制肝癌细胞 HepG-2 的生长。

关键词 结核分枝杆菌 Ag85B ESAT6 Hsp16.3 肝癌; HepG-2

中图分类号 R735.7 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 10-1801-04

Effect of Ag85B-Hsp16.3 Ag85B-ESAT6 and Hsp16.3 of Mycobacterium Tuberculosis on Human Hepatoma Carcinoma Cell HepG-2 in Vitro*

YANG Wei¹, SHI Chang-hong^{2△}, ZHANG Cai-qin², ZHAO Yong², ZHAO Shan-min², ZHAO Zuo-qing^{1△}

(1 Experimental Surgery Department of Tangdu Hospital of the Fourth Military Medical University, 710038,

2 Laboratory Animal Center of the Fourth Military Medical University, 710032, Xi'an, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of Ag85B-Hsp16.3, Ag85B-ESAT6 and Hsp16.3 of Mycobacterium tuberculosis (MTB) on HepG-2 in vitro. **Methods** The three recombinant plasmids (pProEXHTa-Ag85B-Hsp16.3, pProEXHTa-Ag85B-ESAT6 and pProEXHTb-Hsp16.3) were transferred into *E.coli* DH5 α respectively. The three proteins were induced by IPTG and purified by Ni-NTA purification system under denaturing condition. Following renaturation by dialysis and filtration, the three proteins were respectively added into HepG-2 cells of various concentration (10 μ g/ml, 20 μ g/ml, 40 μ g/ml and 80 μ g/ml). The cells were incubated for 24h or 48h, and then the inhibition rate was examined by MTT test assay. **Results** The proteins were successfully purified and all had a moderate killing effect on HepG-2 cells. The effect was dependent on the concentration of the protein as well as the action time. But there was no statistical difference between different proteins. **Conclusion** Some of the secreted proteins of Mycobacterium tuberculosis can inhibit cell growth of liver cancer cell HepG-2.

Key words: Mycobacterium tuberculosis; Ag85B; ESAT6; Hsp16.3; HepG-2

Chinese Library Classification(CLC): R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2011) 10-1801-04

前言

目前临床肿瘤治疗仍然以肿块切除联合放疗、化疗等为主要手段。1976 年 Morales A 等^[1]首次报道了卡介苗(bacillus Calmette-Guerin, BCG)对浅表性膀胱癌的治疗效果并被普遍认可，免疫治疗在临床上的应用引起了广泛重视^[2-4]，但具体机制仍不清楚。张子臻等^[5]发现一定浓度的结核菌素对于肿瘤细胞

的生长具有抑制作用，然而结核菌素的各种成分具体有何作用仍需进一步研究。

结核菌素指结核分支杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 的培养滤液蛋白，其主要成份包括 Ag85B、ESAT6 和 Hsp16.3 等。Ag85B 又称 MPB59，是 MTB 早期培养滤液中分泌蛋白的重要组成部分之一，与 MTB 的细胞壁合成有关^[6]；早期分泌性蛋白 ESAT6 是 MTB 毒株中存在而减毒株中没有的差异

* 基金项目 国家“863”专项课题 (2007AA02Z473)，国家自然科学基金 (NO.30972767)，陕西省自然科学基金项目 (SJ08C203) 资助

作者简介 杨巍(1984-)，男，硕士生，研究方向 肝癌的基础治疗，电话：15191439800，E-mail: 162231759@qq.com

△通信作者：赵佐庆，教授，Email: zuoqing9218@sina.com

2 师长宏，副教授，Email: changhong@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2011-01-08 接受日期 2011-01-30)

蛋白^[7]。Hsp16.3 蛋白是 MTB 在休眠期间表达量增加最多的蛋白,它与 MTB 的休眠极其相关^[8-9]。本研究通过检测肝癌细胞株 HepG-2 对 MTB 融合蛋白 Ag85B-Hsp16.3、Ag85B-ESAT6 以及分泌蛋白 Hsp16.3 的反应,探讨这几种蛋白成分对肝癌细胞的作用。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

大肠杆菌 *E. coli* DH5 α , 三种表达质粒 pProEXHTa-Ag85B-Hsp16.3^[10]、pProEXHTa-Ag85B-ESAT6^[11]和 pProEXHTb-Hsp16.3^[12]均由本实验室构建保存;肝癌 HepG-2 细胞由本实验室冻存;0.22 μ m 过滤器购自 Millipore 公司;96 孔板购自 BIOFIL 公司。

IPTG 和噻唑蓝 (MTT) 购自 Sigma 公司;含有 Ni²⁺ 螯合剂的 Ni-NTA His 纯化试剂盒购自 Invitrogen 公司;Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究所;RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司;新生牛血清购自杭州四季青公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 三种目的蛋白的诱导表达 分别将包含 pProEXHTa-Ag85B-Hsp16.3、pProEXHTa-Ag85B-ESAT6 和 pProEXHTb-Hsp16.3 重组质粒的 3 种菌株,接种于含氨苄青霉素的 LB 培养基中,37℃ 过夜震荡培养,转接入 100 ml 含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,培养至 OD₆₀₀ 值达到 0.6~1.0,加入终浓度为 1 mmol/L 的诱导剂 IPTG,诱导培养 4 h 后收集菌体沉淀。取 100 μ l 的菌样,加入等量的 2 $\times$ 上样缓冲液,沸水煮 10 min,离心后取 10 μ l 上清,进行 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析,观察目的蛋白的诱导表达状况。

1.2.2 三种目的蛋白的纯化 于 pProEXHTa-Ag85B-Hsp16.3、pProEXHTa-Ag85B-ESAT6 和 pProEXHTb-Hsp16.3 这 3 种目的蛋白的表达载体都带有 6 $\times$ His 的标签,采用含 Ni²⁺ 螯合剂的 Ni-NTA His 纯化试剂盒进行纯化。将收集到的每种菌体沉淀用含有 8 M 尿素的 Binding buffer 重悬,超声裂解,按照产品说明书进行纯化操作。最后将纯化得到的目的蛋白进行透析,透析液是分别含有 6 M、4 M、2 M、1 M 尿素的 PBS 溶液,每步透析至少 4 h。蛋白复性后在超净台分别用滤器过滤除菌,-20℃ 冻存备用。

1.2.3 蛋白浓度的测定 根据 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒的说明书进行操作,绘制标准曲线,并计算出每种待测蛋白质的浓度。

1.2.4 肿瘤细胞株的培养 将肝癌细胞株 HepG-2 在 37℃ 水浴中复苏,置于含有 10%新生牛血清、青霉素 100 IU/ml 和链霉素 100 U/ml 的 RPMI1640 培养液,调整细胞浓度至 1 $\times$ 10⁵/ml,然后加入 96 孔培养板,每孔加 100 μ l,在 37℃ 体积分数为 5%CO₂、饱和湿度下 CO₂ 孵箱闭式培养 24 h 后,每孔补加含有 10%新生牛血清、青霉素 100 IU/ml 和链霉素 100 U/ml 的 RPMI1640 培养液 100 μ l,并按照实验分组加入不同种类不同剂量的蛋白或对照溶剂,按照实验分组的蛋白作用时间培养。

1.2.5 实验分组 实验按照加入的不同蛋白分为 3 组,每种蛋白再按照作用时间分为 24 h 和 48 h 两组,相同的作用时间又

分为 6 组,即空白对照组,蛋白溶剂对照组 (加入溶解蛋白质所用的溶剂),以及 4 组不同蛋白终浓度的实验组。

1.2.6 MTT 实验 每组到达规定的作用时间后,每孔加入 20 μ l MTT (5 mg/ml),继续培养 4 h,弃上清液,每孔加入 150 μ l 二甲亚砜 (DMSO),微量振荡器摇匀 10 min,在波长 490 nm 测定光密度值 (OD),以加入蛋白溶剂的细胞作为对照组,用下面公式计算蛋白对肿瘤细胞的抑制率:抑制率 IR (%) = (对照组平均 OD 值 - 加药组平均 OD 值) / 对照组平均 OD 值 $\times$ 100%。

1.2.7 数据处理 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用统计软件 SPSS16.0 中方差分析和 q 检验进行样本均数之间的两两比较

2 结果

2.1 三种目的蛋白的表达和纯化

Ag85B-Hsp16.3、Ag85B-ESAT6 和 Hsp16.3 这三种目的蛋白的分子量分别约为 48 kDa、45 kDa 和 16.3 kDa。用 IPTG 诱导重组宿主菌,分别表达了相应大小的目的蛋白,并通过 Ni-NTA His 纯化试剂盒分别得到了纯度 90% 以上的 3 种目的蛋白,如图 1 所示。

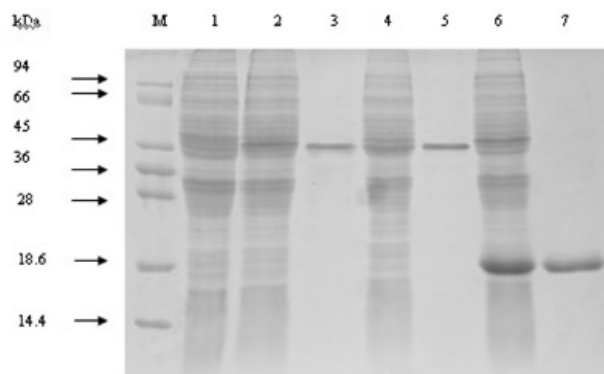


图 1 三种目的蛋白的诱导表达和纯化电泳图 M: 蛋白标志物; 1: 未诱导的 DH5 α ; 2: pProEXHTa-Ag85B-Hsp16.3 的表达产物; 3: pProEXHTa-Ag85B-Hsp16.3 的纯化产物; 4: pProEXHTa-Ag85B-ESAT6 的表达产物; 5: pProEXHTa-Ag85B-ESAT6 的纯化产物; 6: pProEXHTb-Hsp16.3 的表达产物; 7: pProEXHTb-Hsp16.3 的纯化产物

Fig.1 SDS-PAGE analysis of expressed and purified products M: Protein marker; 1: DH5 α without induction; 2: Expression product of pProEXHTa-Ag85B-Hsp16.3; 3: Purified product of pProEXHTa-Ag85B-Hsp16.3; 4: Expression product of pProEXHTa-Ag85B-ESAT6; 5: Purified product of pProEXHTa-Ag85B-ESAT6; 6: Expression product of pProEXHTb-Hsp16.3; 7: Purified product of pProEXHTb-Hsp16.3

2.2 蛋白浓度的测定

利用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测得的三种蛋白抗原,Ag85B-Hsp16.3、Ag85B-ESAT6 和 Hsp16.3 的浓度分别为 0.44 mg/ml、0.49 mg/ml 和 1.13 mg/ml。

2.3 MTT 数据的统计学分析

三种蛋白终浓度为 10 μ g/ml 时,对 HepG-2 细胞的影响均没有统计学意义;三种蛋白终浓度在 20、40、80 μ g/ml,作用于肝癌细胞 HepG-2 后,细胞生长受抑制,与对照组相比差异有

统计学意义 ($P<0.05$) , 细胞生长抑制率随药物浓度和作用时间 分别是 24 h 和 48 h) 。
间的增加而升高,具有时间和剂量依赖性 (如表 1、2,作用时间

表 1 三种蛋白对 HepG-2 细胞增值的影响 ($\bar{x}\pm s$,n=24,24h)
Table 1 Effect of proteins on HepG-2 cells in vitro ($\bar{x}\pm s$, n=24, 24h)

proteins	empty	control	10 μ g/ml		20 μ g/ml		40 μ g/ml		80 μ g/ml	
	OD	OD	OD	IR(%)	OD	IR(%)	OD	IR(%)	OD	IR(%)
Ag85B-	0.463 $\pm$	0.471 $\pm$	0.466 $\pm$	1.06	0.447 $\pm$	5.10	0.412 $\pm$	12.53	0.380 $\pm$	19.32
Hsp16.3	0.031	0.046	0.034		0.027*		0.025**		0.039**	
Ag85B-	0.479 $\pm$	0.466 $\pm$	0.448 $\pm$	3.86	0.433 $\pm$	7.08	0.431 $\pm$	7.51	0.394 $\pm$	15.45
ESAT6	0.055	0.037	0.051		0.058*		0.063*		0.042**	
Hsp16.3	0.477 $\pm$	0.468 $\pm$	0.454 $\pm$	2.99	0.411 $\pm$	12.18	0.412 $\pm$	11.97	0.387 $\pm$	17.31
	0.046	0.041	0.039		0.041**		0.031**		0.056**	

Note 与Control group比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

表 2 三种蛋白对 HepG-2 细胞增值的影响 ($\bar{x}\pm s$,n=24,48h)
Table 2 Effect of proteins on HepG-2 cells in vitro ($\bar{x}\pm s$, n=24, 48h)

proteins	empty	control	10 μ g/ml		20 μ g/ml		40 μ g/ml		80 μ g/ml	
	OD	OD	OD	IR(%)	OD	IR(%)	OD	IR(%)	OD	IR(%)
Ag85B-	0.571 $\pm$	0.560 $\pm$	0.557 $\pm$	0.536	0.494 $\pm$	11.79	0.435 $\pm$	22.32	0.400 $\pm$	28.57
Hsp16.3	0.056	0.047	0.050		0.058**		0.066**		0.051**	
Ag85B-	0.525 $\pm$	0.514 $\pm$	0.501 $\pm$	2.53	0.483 $\pm$	6.03	0.398 $\pm$	22.57	0.331 $\pm$	35.60
ESAT6	0.048	0.037	0.031		0.039**		0.037**		0.049**	
Hsp16.3	0.548 $\pm$	0.521 $\pm$	0.503 $\pm$	3.45	0.453 $\pm$	13.05	0.434 $\pm$	16.70	0.408 $\pm$	21.69
	0.054	0.059	0.047		0.054**		0.060**		0.059**	

Note 与Control group比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$.

3 讨论

1976 年 Morales A 等^[1]首次发现 BCG 对于治疗浅表性膀胱癌有效,目前这一治疗方法已被普遍认可^[13-15]。研究^[16]认为,BCG 治疗浅表性膀胱癌与免疫反应相关,其过程以细胞免疫为主。另外 BCG 灌注后产生的一些细胞因子也被认为具有抑制肿瘤生长作用,如干扰素(interferon, IFN)- γ 、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,TNF)- α 、白介素 (interleukin, IL)-12 和 IL-18 等^[17]。多项体外试验^[18-20]显示,BCG 对膀胱癌细胞还具有直接作用,能诱导肿瘤细胞凋亡。但是至今 BCG 治疗膀胱癌的确切机制仍不完全清楚。一般认为,BCG 中所含的蛋白质、脂质及糖类等成分均可刺激患者的免疫反应,但目前尚无研究证实具体是哪组成成分引起其肿瘤免疫治疗效应。Zlotta AR 等^[21]在研究中发现,BCG 培养液刺激膀胱癌患者淋巴增生反应的能力高于 BCG 菌体,提示培养液中结核杆菌分泌的多种抗原蛋白可能对于 BCG 治疗膀胱癌具有重要作用。

张子臻等^[9]发现一定浓度的结核菌素对于肿瘤细胞的生长具有抑制作用,这种抑制作用在不同的肿瘤细胞具有一定的普遍性,其机制可能与结核菌素中某些细胞因子诱导肿瘤细胞凋亡的能力有关。然而结核菌素是结核分枝杆菌的培养滤液蛋白,是一种复杂的混合物,包含多种成分,张子臻等的研究并不

能说明结核菌素中各个成分的具体作用。

本实验旨在研究结核菌素中的几种单纯蛋白成分对肝癌细胞生长的影响。Ag85B 是 BCG 和 MTB 及其它分枝杆菌最主要的分泌蛋白^[22],也是 BCG 在体内发挥生物学作用的主要成分,能够诱导机体强烈的 Th1 免疫反应^[23]。ESAT6 是结核杆菌早期分泌性低分子量蛋白,能诱导机体产生强烈 T 细胞免疫应答和释放高水平 IFN- γ ,许多研究表明 ESAT6 蛋白具有良好的抗原刺激性,诱导较强的细胞免疫应答,是机体抗结核感染的有效靶抗原^[24]。Hsp16.3 是 MTB 在休眠期间表达量增加最多的蛋白,它与 MTB 的休眠及潜伏感染密切相关^[25]。因此,本实验表达纯化了这几种蛋白,以不同蛋白终浓度 (10、20、40 和 80 μ g/ml) 与肝癌细胞株 HepG-2 进行反应,在反应 24 h 和 48 h 后,用 MTT 实验检测蛋白对肿瘤细胞的抑制率。同时为了避免蛋白纯化后溶解蛋白的溶剂对实验结果的影响,用相应最大体积的溶剂处理细胞作为对照组。发现在低浓度 (10 μ g/ml) 时几种蛋白对肿瘤细胞生长的影响均不明显,实验组与对照组相比无显著差异;而在高浓度 (20、40、和 80 μ g/ml) 时,肿瘤细胞生长受到明显抑制,且随着浓度增高,抑制作用更加明显,与对照组相比差异显著。在反应时间方面,作用 48 h 后的细胞抑制效果比 24 h 更为明显。不同蛋白对 HepG-2 细胞都具有抑制作

用,但蛋白与蛋白之间的抑制作用差异无统计学意义,尚不能认为不同蛋白对 HepG-2 的作用存在差别。

实验结果显示单纯的 MTB 分泌蛋白对于肝癌细胞也能产生明显的作用,而这种不含有其它成分或免疫细胞的结核菌素蛋白,可能是通过免疫作用以外的机制产生肿瘤抑制效应的。刘洪等^[26]发现骨形成蛋白-2 通过 JNK 信号通路可促进肝癌 HepG-2 细胞凋亡,也能佐证特定蛋白可直接作用于肿瘤细胞,通过特定途径导致凋亡。我们的实验结果提示,MTB 分泌蛋白可能也是通过某些信号通路诱导肝癌细胞凋亡的,其作用机制还需更深入的研究。MTB 分泌蛋白直接诱导肝癌细胞凋亡将为肝癌生物治疗提供新的思路和研究手段。

参考文献(References)

- [1] Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors[J]. J Uro, 1976,116(2):180-183
- [2] Popiela T, Kulig J, Czupryna A, et al. Efficiency of adjuvant immunohemotherapy following curative resection in patients with locally advanced gastric cancer[J]. Gastric Cancer, 2004,7(4):240-245
- [3] Peng BG, Liang LJ, He Q, et al. Tumor vaccine against recurrence of hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroentero, 2005, 11(5):700-704
- [4] Vermorken JB, Claessen AM, Van Tinteren H, et al. Active specific immunotherapy for stage II and stage III human colon cancer: A randomised trial[J]. Lancet, 1999, 353(9150):345-350
- [5] 张子臻,沈艳莹,倪醒之,等.结核菌素对肝癌和肺癌肿瘤细胞生长和凋亡的调控作用[J].上海交通大学学报(医学版),2008,28(8):983-986
ZHANG Zi-zhen, SHEN Yan-ying, NI Xing-zhi, et al. Regulatory effects of tuberculin on growth and apoptosis of liver cancer and lung cancer cell lines. Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science), 2008, 28(8):983-986(In Chinese)
- [6] Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, et al. Role of the major antigen of Mycobacterium tuberculosis in cell wall biogenesis [J]. Science, 1997,276:1420-1422
- [7] Britton WJ, Palendira U. Improving vaccines against tuberculosis[J]. Immunology and cell biology, 2003, 81(1):34-35
- [8] Starck J, Kallenius G, Marklund BI, et al. Comparative proteome analysis of Mycobacterium tuberculosis grown under aerobic and anaerobic conditions[J]. Microbiology, 2004, 150(11):3821-3829
- [9] Monahan IM, Betts J, Banerjee DK, et al. Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages [J]. Microbiology, 2001, 147 (2): 459-471
- [10] 杨巍,师长宏,赵佐庆,等.结核分枝杆菌融合蛋白 Ag85B-Hsp16.3 的表达、纯化和鉴定[J].中国人兽共患病学报,2010,26(10):953-956
YANG Wei, SHI Chang-hong, ZHAO Zuo-qing, et al. Expression, purification and identification of the fusion protein Ag85B-Hsp16.3 of Mycobacterium tuberculosis [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2010,26(10): 953-956(In Chinese)
- [11] 刘建利,师长宏,靳亚平,等.结核分枝杆菌 Ag85B 和 ESAT6 融合蛋白的表达、纯化及抗原活性的初步研究[J].中国人兽共患病学报, 2009,25(5):449-452
LIU Jian-li, SHI Chang-hong, JIN Ya-ping, et al. Expression, purification of the fusion protein Ag85B-ESAT6 of Mycobacterium tuberculosis and its antigenic activity[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2009,25(5):449-452(In Chinese)
- [12] 张廷芬,师长宏,朱德生,等.结核分枝杆菌 Hsp16.3 的表达、纯化和鉴定[J].中国人兽共患病学报,2007,23(10):964-967
ZHANG Ting-fen, SHI Chang-hong, ZHU De-sheng, et al. Expression, purification and identification of Hsp16.3 protein from Mycobacterium tuberculosis [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2007,23(10):964-967 (In Chinese)
- [13] Kaasinen ES, Harju LM, Alfthan OS, et al. Non-specific, rapidly generated cytotoxicity in lymphocytes induced by BCG in vitro: no evidence of enhancing effect from preceding interaction between BCG and transitional cell line cells[J]. J Uro, 2000,163(1):317-322
- [14] Zlotta AR, van Vooren JP, Huygen K, et al. What is the optimal regimen for BCG intravesical therapy Are six weekly instillations necessary [J]. Eur Uro, 2000,37(4):470-477
- [15] Amling CL. Diagnosis and management of superficial bladder cancer [J]. Curr Prob Cancer, 2001,25(4):219-278
- [16] Simons MP, Nauseef WM, Griffith TS. Neutrophils and TRAIL: insight into BCG immunotherapy for bladder cancer [J]. Immuno Res, 2007,39(1-3):79-93
- [17] O Donnell MA, Luo Y, Chen X, et al. Role of IL-12 in the induction and potentiation of IFN-gamma in response to bacillus Calmette Guérin[J]. J Immuno, 1999,163(8):4246-4252
- [18] Sasaki A, Kudoh S, Mori K, et al. Are BCG effects against urinary bladder carcinoma cell line T24 correlated with apoptosis in vitro?[J]. Urol Int, 1997,59(3):142-148
- [19] Seow SW, Rahmat JN, Mohamed AA, et al. Lactobacillus species is more cytotoxic to human bladder cancer cells than Mycobacterium Bovis (bacillus Calmette-Guerin) [J]. J Uro, 2002,168(5):2236-2239
- [20] Chen F, Zhang G, Cao Y, et al. Bacillus Calmette-Guerin inhibits apoptosis in human urothelial carcinoma cell lines in response to cytotoxic injury[J]. J Uro, 2007,178(5):2166-2170
- [21] Zlotta AR, Drowart A, Van Vooren JP, et al. Evolution and clinical significance of the T cell proliferative and cytokine response directed against the fibronectin binding antigen85 complex of bacillus Calmette-Guerin during intravesical treatment of superficial bladder cancer [J]. J Uro, 1997,157(2):492-498
- [22] Harth G, Lee BY, Wang J, et al. Novel insights into the genetics, biochemistry and immunocytochemistry of the 30-kilodalton major extracellular protein of Mycobacterium tuberculosis[J]. Infect Immun, 1999,64(8):3038-3047
- [23] Lim JH, Park JK, Jo EK, et al. Purification and immunoreactivity of three components from the 30/32-kilodalton antigen 85 complex in Mycobacterium tuberculosis[J]. Infect Immun, 1999,67(11):6187-6190
- [24] Doherty TM, Demissie A, Olobo J, et al. Immune responses to the Mycobacterium tuberculosis specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patient [J]. Clin Microbiol, 2002, 40:704-706
- [25] Starck J, Kallenius G, Marklund BI, et al. Comparative proteome analysis of Mycobacterium tuberculosis grown under aerobic and anaerobic conditions[J]. Microbiology, 2004,150(11), 3821-3829
- [26] 刘洪,唐四元.骨形成蛋白-2 通过 JNK 信号通路促进肝癌 HepG2 细胞凋亡[J].实用预防医学,2009,16(4):1021-1024
Liu Hu, Tang Si-yuan. BMP-2 Induces Apoptosis of Human Hepatocellular Carcinoma Cell HepG2 via JNK Signaling Pathway [J]. Practical Preventive Medicine, 2009,16 (4):1021-1024 (In Chinese)