

外源质粒 DNA 经小鼠胃肠道的吸收代谢动力学

刘建文, 施用晖, 乐国伟, 方希修

刘建文, 施用晖, 乐国伟, 方希修, 江南大学营养与生物技术教研室, 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江苏省无锡市 214036
刘建文, 男, 1977-04-28 生, 福建仙游人, 汉族, 1999 年无锡轻工大学本科毕业, 现江南大学分子营养学博士研究生, 主要从事分子营养与代谢调控研究。国家自然科学基金资助项目, No. 30270970
项目负责人: 乐国伟, 214036, 江苏省无锡市惠河路 170 号, 江南大学营养与生物技术教研室, 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 1gw@sytu.edu.cn
电话: 0510-5869236 传真: 0510-5869236
收稿日期: 2003-11-18 接受日期: 2004-01-08

Metabolic kinetics of foreign plasmid DNA uptake via gastrointestinal tract in mice

Jian-Wen Liu, Yong-Hui Shi, Guo-Wei Le, Xi-Xiu Fang

Jian-Wen Liu, Yong-Hui Shi, Guo-Wei Le, Xi-Xiu Fang, Department of Nutrition and Biological Technology, Department of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, Jiangsu Province, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30270970

Correspondence to: Dr. Guo-Wei Le, Department of Nutrition and Biological Technology, Southern Yangtze University, 170 Huihe Road, Wuxi 214036, Jiangsu Province, China. 1gw@sytu.edu.cn
Received: 2003-11-18 Accepted: 2004-01-08

Abstract

AIM: To analyse the changes of foreign plasmid copies in different tissues after uptake via gastrointestinal tract and to evaluate the possibility of foreign plasmid integrating on the host genome.

METHODS: Samples including lung, kidney, spleen, mesenteric lymph node, thymus, gonads, feces, duodenum, large intestine, blood and liver were obtained 1, 3, 6, 24, and 48 h and 3, 6 wk after oral administration of 200 µg plasmid pcDNA3s. PCR technique was used to detect the distribution and kinetics of plasmid in different tissues. Genomic DNA was assayed for integrated plasmid by PCR after purification of high-molecular-weight genomic DNA away from free plasmid by using gel electrophoresis.

RESULTS: Plasmid could be detected in almost all tissues 1 h after oral administration and the copies of plasmid in tissues changed with time. Foreign plasmid could be detected only in kidney and blood at sixth week time. Foreign plasmid mainly as fragment survived in vivo.

CONCLUSION: Foreign plasmid can be absorbed by gastrointestinal tract and distribute in different tissues quickly, surviving as the form of fragment. Foreign plasmid DNA probably integrates into the host genome via the gastrointestinal tract.

Liu JW, Shi YH, Le GW, Fang XX. Metabolic kinetics of foreign plasmid DNA uptake via gastrointestinal tract in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1108-1113

摘要

目的: 分析外源质粒 pcDNA3s 经胃肠道吸收后在组织中的动态变化, 评价外源质粒整合到宿主基因组上的可能性。

方法: 分别于灌胃 200 µg 质粒 pcDNA3s 后 1, 3, 6, 24, 48 h 及 3, 6 wk, 提取小鼠肺、肾、脾、肠系膜淋巴结、胸腺、生殖器官、粪便、十二指肠、大肠、血液及肝脏的总 DNA, 通过 PCR 方法检测质粒 pcDNA3s 在各组织中的分布及随时间变化的情况。琼脂糖凝胶分离高分子量基因组 DNA 与游离质粒, PCR 方法检测外源质粒在基因组 DNA 上的整合情况。

结果: 灌胃给药后 1 h 所有的组织均能检测到质粒的存在, 质粒在组织中的拷贝数水平随时间的推移呈动态变化, 至 6 wk 仅在肾脏和血液中检测到外源质粒, 质粒在体内主要以碎片的形式存在。

结论: 外源质粒能被胃肠道吸收, 迅速分布全身各个器官并以碎片的形式在体内存留较长的时间。外源质粒 DNA 经胃肠道途径有可能整合到宿主染色体基因组上。

刘建文, 施用晖, 乐国伟, 方希修. 外源质粒 DNA 经小鼠胃肠道的吸收代谢动力学. *世界华人消化杂志* 2004;12(5):1108-1113

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1108.asp>

0 引言

哺乳动物胃肠道是外源 DNA 进入机体的主要器官^[1-3]。外源 DNA 进入胃肠道后在胃的酸性环境和肠道核酸酶的攻击下, 迅速降解成碎片随粪便排出, 一小部分外源 DNA 能够以碎片的形式进入机体, 随血液循环分布于各个器官组织中^[4]。外源 DNA 在肠道降解不完全, 能够由肠壁上皮细胞吸收, 经淋巴结, 然后通过外周血液白细胞运送到各个器官中。以上说明胃肠道对外源 DNA 并非是一个不可穿越的屏障^[4-7]。与其他营养物质一样, 外源 DNA 经胃肠道吸收后, 可以递呈到机体的外周与中枢系统中, 可能插入到哺乳动物基因组上, 引起宿主基因组的缺失和重排, 改变宿主基因组相关基因的转录活性, 可能激活原癌基因、抑制抑癌基因而导致致癌。宿主基因组会通过改变 DNA 甲基化模式这一古老的细胞防御机制来抵抗外源 DNA 的入侵^[8-10]。因此经口服摄入外源 DNA 对哺乳动物基因组长期进化的影响是一个不容忽视的问题。我们采用裸 DNA (质粒 pcDNA3s) 作为研究对象, 考察质粒 pcDNA3s 经胃肠道给药后在小鼠体内

的组织分布及其整合情况.

1 材料和方法

1.1 材料 昆明种小鼠, 6 周龄, 雌雄各半, 体质量 20 ± 2 g, 由江苏省实验动物中心提供. 大肠杆菌 JM109 及重组质粒 pcDNA3s 由本室保存, pcDNA3 上 BamHI 与 EcoRI 位点之间插入 HBsAg 抗原基因, 长度为 930 bp, 质粒 pcDNA3s 总长约 6 400 bp. pcDNA3s 上具有 CMV 启动子, 可在大肠杆菌中复制, 在真核细胞中表达外源抗原, 是一种典型的真核表达载体. 大量制备质粒, 碱裂解法大量提取 5 L 发酵液, 酚 / 氯仿 / 异戊醇(25 : 24 : 1) 抽提, 2 倍体积无水乙醇沉淀, RNase 酶去除 RNA, 聚乙二醇纯化, TE(pH8.0)溶解沉淀, -20 ℃ 保存备用^[11].

1.2 方法 给每只小鼠灌胃 pcDNA3s 质粒溶液 200 μL (1 g/L), 于灌胃后 1, 3, 6, 24, 48 h 及 3, 6 wk 宰杀雌雄各 3 只及对照组 (空白 TE 溶液)1 只. 分离肺、肾、脾、肠系膜淋巴结、胸腺、生殖器官、十二指肠、大肠、血液、肌肉及肝脏等, 分离后的组织分别放入塑料口袋中封口, 在液氮中快速冷冻, 于 -80 ℃ 保存待用. 取 50 mg 的新鲜组织加入 DNA 提取缓冲液[0.4 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 2 mmol/L EDTA (pH8.0)], 用匀浆器彻底匀浆后, 加入 100 g/L 的 SDS 40 μL, 5 g/L 蛋白酶 K(终浓度 400 mg/L) 32 μL, 充分混匀后放入 55 ℃ 水浴锅中温浴 2 h, 加 6 mol/L NaCl 300 μL, 混匀, 10 000 rpm/min 离心 15min, 移上清到另一离心管中, 等体积的酚 - 氯仿抽提一次, 无水乙醇沉淀, 沉淀得到的 DNA 用 20 mg/L RNA 酶溶液 400 μL 溶解, 37 ℃ 水浴 30 min, 等体积的酚 - 氯仿、氯仿各抽提一次, 无水乙醇沉淀, 沉淀以 700 mL/L 的乙醇漂洗后用无菌水溶解. 检测 DNA 样品在 260 nm/280 nm 下的吸光度 A 值, 确保二者之比大于 1.8, 同时进行 5 g/L 的琼脂糖凝胶电泳确保 DNA 的完整性并无 RNA^[17].

1.2.1 PCR 扩增检测组织中质粒 DNA 采用两对引物分别扩增 pcDNA3s 质粒上部分抗原基因序列(antigen)和整个抗原基因序列(T7-SP6), 引物设计采用 oligo6.0, 引

物序列: Antigen, P1: 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA 3'; P2: 5' TAG TTG ATG TTC CTG GAA GTA 3', 396 bp; T7-SP6, P3: 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA 3', P4: 5' GAT TTA GGT GAC ACT ATAG 3', 1 065 bp. PCR 反应体积 50 μL, 含有 10 × 缓冲液(含 MgCl₂ 15 mmol/L), dNTP 各 200 μmol/L, 上下游引物各 100 pmol, DNA 模板 10 μL, TaqDNA 聚合酶 1 μL, 无菌去离子水 36 μL. PCR 扩增热循环条件如下: 第 1 个循环 95 ℃, 10 min; 第 2 个循环 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min 35 cycle; 第 3 个循环 72 ℃ 10 min 4 ℃ 保存. 每一种组织来源的样本均设立各自的参比对照系列.

1.2.2 质粒 DNA 整合情况检测 按上述方法抽提不同组织及不同时间的基因组 DNA. 将各组基因组 DNA 用 EcoRI 酶切, 使游离状态及多聚状态质粒变成线性单体(整合入基因组的质粒只能在酶切位点才将基因组切开, 而不能将质粒从基因组上切下来), 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳回收后再次 PCR 扩增. 在 1 μg 无灌胃质粒的鼠基因组 DNA 中加入不同拷贝数的阳性质粒, 用来评估质粒检测的敏感性.

1.2.3 粪便中筛选 pcDNA3s 质粒阳性克隆 收集不同时间的粪便, 重悬于 LB 液体培养基中, 37 ℃ 水浴温育 1 h 后, 涂布于含有 Ampicillin 的平板上, 24 h 后观察细菌菌落的生长情况.

统计学处理 应用 SPSS 统计软件进行方差分析统计学处理.

2 结果

2.1 pcDNA3s 质粒的组织分布 外源质粒在小鼠体内不同组织的质粒拷贝数水平不同, 得到阳性扩增条带为 396 bp 短片段 PCR 产物(结果见表 1、图 2-11). 用 T7、SP6 引物扩增组织每个时间点总 DNA 结果显示, 仅在极其个别的器官中检测到微弱的阳性条带, 绝大部分组织各时间点均呈阴性, 提示外源质粒在胃肠道环境下迅速被降解, 外源质粒仅以小片段形式进入机体(图 12).

表 1 不同组织的质粒 DNA 拷贝数水平比较

组织 时间	肺	肾	脾	肠系膜淋巴结	粪便	胸腺	生殖器官	肌肉	十二指肠	大肠	血液	肝脏
30 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 h	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
3 h	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
6 h	+	+	+	+	++	+	+	+	++	ND	-	+
24 h	++	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	++
3 wk	+	+	-	++	+	+	-	++	-	ND	++	++
6 wk	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

+: 阳性; -: 阴性; ND: 未检测.

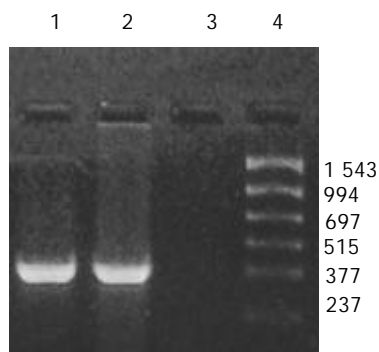


图1 质粒阳性与阴性对照 PCR 结果. 1: 灌胃质粒 pcDNA3s 溶液的小鼠组织 DNA; 2: 质粒 pcDNA3s; 3: 灌胃 TE 溶液的小鼠组织 DNA; 4: Marker.

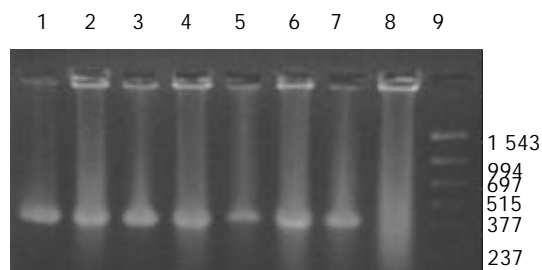


图2 灌胃 1 h 后各组织 DNA 的 PCR 结果. 1: 肺; 2: 肾; 3: 脾; 4: 肠系膜淋巴结; 5: 胸腺; 6: 生殖腺; 7: 肌肉; 8: 十二指肠; 9: Marker. Marker: 1: 1 543 bp; 2: 994 bp; 3: 697 bp; 4: 515 bp; 5: 377 bp; 6: 237 bp.

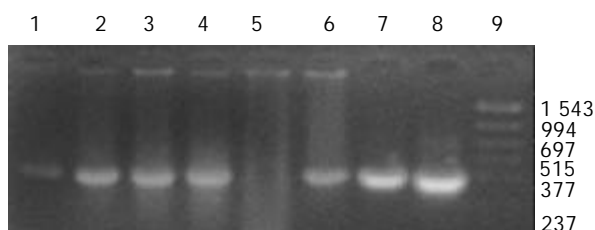


图3 灌胃 3 h 后各组织 DNA 的 PCR 结果. 1: 肺; 2: 肾; 3: 脾; 4: 十二指肠; 5: 肠系膜淋巴结; 6: 1 h 肝脏; 7: 3 h 肝脏; 8: 6 h 肝脏; 9: Marker.

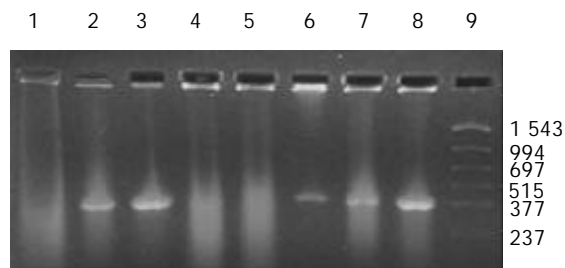


图4 1: 1 h 十二指肠; 2: 3 h 十二指肠; 3: 6 h 十二指肠; 4: 24 h 十二指肠; 5: 10 wk 十二指肠; 6: 3 h 粪便; 7: 3 h 大肠; 8: 3 h 肌肉; 9: Marker.

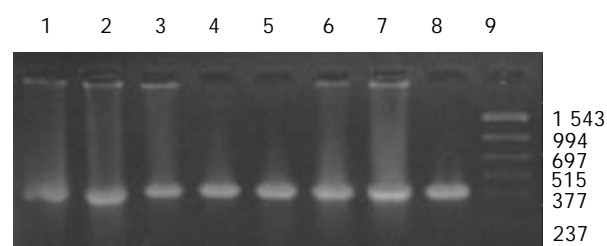


图5 灌胃 6 h 后各组织 DNA 的 PCR 结果. 1: 肺; 2: 肾; 3: 脾; 4: 肠系膜淋巴结; 5: 粪便; 6: 胸腺; 7: 生殖腺; 8: 肌肉; 9: Marker.

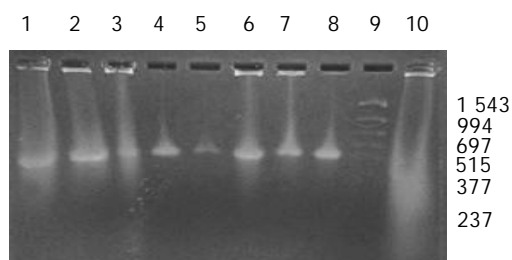


图6 灌胃 24 h 后各组织 DNA 的 PCR 结果. 1: 肺; 2: 肾; 3: 脾; 4: 肠系膜淋巴结; 5: 粪便; 6: 胸腺; 7: 生殖腺; 8: 肌肉; 9: Marker; 10: 大肠.

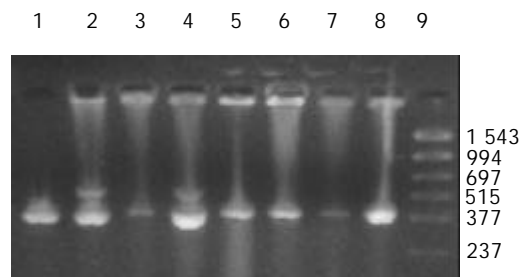


图7 灌胃 3 wk 后各组织 DNA 的 PCR 结果. 1: 肺; 2: 肾; 3: 脾; 4: 肠系膜淋巴结; 5: 粪便; 6: 胸腺; 7: 生殖腺; 8: 肌肉; 9: Marker.

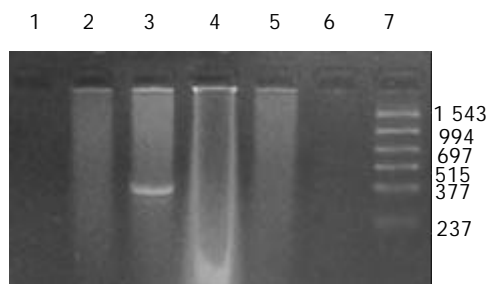


图8 灌胃 6 wk 后各组织 DNA 的 PCR 结果. 1: 阴性对照; 2: 肝脏; 3: 肾脏; 4: 十二指肠; 5: 肌肉; 6: 阴性对照; 7: Marker.

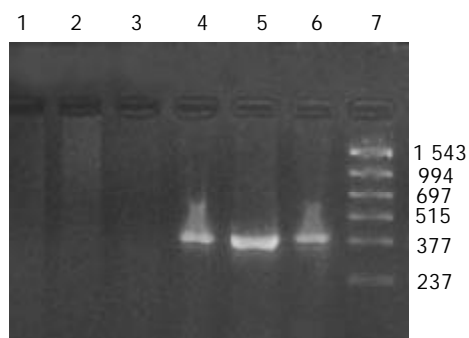


图9 不同时间血液的 PCR 扩增结果. 1: 1 h; 2: 3 h; 3: 6 h; 4: 24 h; 5: 3 wk; 6: 6 wk; 7: Marker.

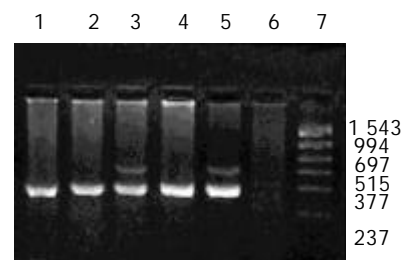


图10 不同时间肝脏的 PCR 扩增结果. 1: 1 h; 2: 3 h; 3: 6 h; 4: 24 h; 5: 3 wk; 6: 6 wk; 7: Marker.

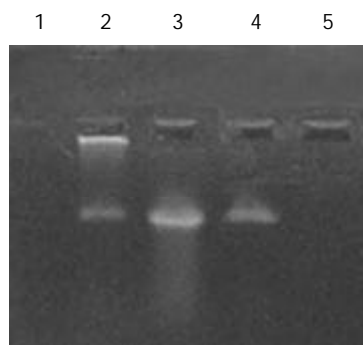


图 11 不同时间粪便的 PCR 扩增结果. 1: 1 h; 2: 3 h; 3: 6 h; 4: 24 h; 5: 3 wk.

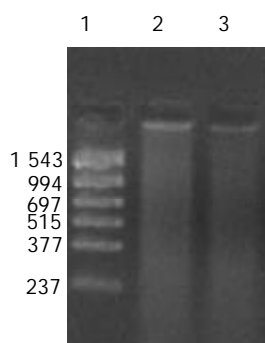


图 12 T7 和 SP6 引物扩增各组织 DNA 的 PCR 结果. 1: Marker; 2: 1 h 肺; 3: 6 h 脾.

2.2 外源质粒 pcDNA3s 整合入宿主基因组 提取 6 h 时肾脏及其生殖器官的总 DNA, 5 g/L 的琼脂糖凝胶分离宿主基因组与游离质粒, PCR 扩增纯化后的基因组 DNA, 可检测到微弱的阳性条带, 说明经口服摄入的外源质粒有可能整合入宿主基因组上. PCR 敏感性参照, 取 100, 50, 25, 10 拷贝质粒 DNA 加入到 1 μ g 基因组 DNA 中, 琼脂糖凝胶观察, 当质粒为 100, 50, 25 拷贝时 PCR 检测为阳性, 10 拷贝时检测为阴性, 说明 PCR 的灵敏度为 25 拷贝. 得到的阳性条带强度较 25 拷贝的 PCR 扩增结果弱, 外源质粒如整合入基因组中, 其拷贝数应低于 25 拷贝(图 13).

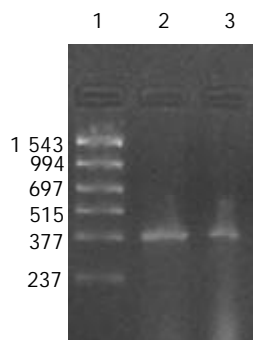


图 13 宿主基因组的 PCR 扩增结果. 1: Marker; 2: 6 h 肾; 3: 6 h 生殖腺.

2.3 肠道中粪便细菌克隆筛选 质粒 pcDNA3s 上带有 ampicillin 抗性基因, 因此用 ampicillin 来筛选粪便细菌中的阳性克隆, 37 $^{\circ}$ C 于琼脂平板上培养 24 h 后, 未

见到阳性克隆. 当然不能排除外源质粒能够被肠道细菌吸收, 但是不能在细菌中复制形成阳性菌落.

3 讨论

胃肠道是外源 DNA 进入哺乳动物机体的最主要途径, 肠上皮细胞的巨大表层为营养素和大分子物质(DNA)的吸收创造了条件^[12-13]. 外源 DNA 随着食物的进入而被胃肠道大量吸收, 同时肠道细菌 DNA 及基因治疗 DNA 也是哺乳动物外源 DNA 的来源. 外源 DNA 经胃肠道吸收后代谢命运及吸收机制一直是人们关心的话题. 黏膜表面, 特别是肠道上段含有大量的抗原递呈细胞、树状细胞、巨噬细胞和 B 淋巴细胞^[12-13]. 他们可以通过胞饮或吞噬作用吞食 DNA. 一旦被激活, 树状细胞迁移到淋巴组织中, 特异性递呈抗原到 T 和 B 淋巴细胞上, 诱导抗原特异性免疫应答. 残留在肠道中的一小部分 DNA 碎片直接通过上皮细胞或免疫系统的抗原递呈细胞被小肠黏膜吸收. 如果肠道上皮表面受到破坏, DNA 和其他大分子可以向固有层扩散. 说明大部分 DNA 能够被组织巨噬细胞、免疫系统的树状细胞或其他末端分化吞噬细胞所吞噬^[14]. 外源 DNA 如细菌 DNA 和质粒 DNA 上含有非甲基化 CpG 基序, 可与胃肠道中免疫细胞上的 TLR9 受体作用, 从而引发免疫应答.

DNA 是一种较为稳定的大分子物质, 能够在极端环境下存在, 并且能够在有机体残骸中存在成千上万年^[1-2]. 那么外源 DNA 是否能抵抗哺乳动物胃肠道的酶系统是个令人关注的问题. 我们结果表明, 外源质粒 pcDNA3s 经胃肠道吸收后, 能够抵抗胃肠道及机体核酸酶的降解, 以碎片形式广泛分布全身各个器官中, 并且在组织中存留较长的时间. 外源质粒给药后在体内的拷贝数水平呈动态变化(见图 2-11). 灌胃后 1 h, 即可在体内检测到质粒的存在, 并且一直持续到 3-6 wk, 仅在肾脏及血液中发现质粒的存在. 3-24 h 内, 可检测出外源质粒在粪便中存在, 至 6 h 时质粒浓度达到最高 ($P < 0.01$)(图 11). 随着时间的推移, 外源质粒在肝脏中的拷贝数水平有增加的趋势. 质粒在肺中 24 h 时, 累积浓度达到最高. 质粒浓度在肾脏中各时间点变化不明显. 脾脏在 1 h、3 h 时质粒的浓度较高, 6 h 时开始逐渐减弱 ($P < 0.05$), 24 h 时急剧减弱 ($P < 0.01$), 至 3 wk 时已无质粒检出. 肠系膜淋巴结至 3 wk 时质粒累积浓度达到最高 ($P < 0.01$), 而且较其他器官高, 肠系膜作为肠道系统的免疫器官, 可识别外源抗原物质(如 DNA), 因此肠系膜也是外源质粒的主要累积器官. Schubert 研究表明外源 M13 由肠黏膜上皮细胞吸收, 经肠系膜淋巴结递呈各个器官中, 肠系膜淋巴结也是外源 DNA 进入机体的一个主要通道^[4]. 与其他器官相比, 胸腺在 1 h 时质粒的浓度相对较低, 其他时间点质粒浓度无显著差别. 外源质粒在生殖器官中的浓度在 1 h、3 h、6 h 保持较高的浓度, 24 h 开始减弱, 至 3 wk 时降为零. 外源质粒可在生殖器官中累积, 因此外源质粒是否可以

通过生殖系统遗传给下一代值得进一步探讨^[15]。肌肉中的质粒浓度一直较高,至3 wk时仅次于肠系膜淋巴结。这与肌纤维细胞具有特殊的结构,较易吸收外源质粒及递呈抗原有关。

我们采用裸 pcDNA3s 为研究对象, Blast 同源性分析及 PCR 阴性对照结果表明(图 1), PCR 扩增目的片段与小鼠基因组、大肠杆菌及食物基因组无同源性序列,保证了扩增的特异性及可行性。质粒 pcDNA3s 作为一种真核表达载体,同时也为口服 DNA 疫苗提供了试验依据。口服灌注质粒 pcDNA3s 后,我们观察到了外源质粒在体内各个组织器官中的广泛分布,随着时间的分布呈动态变化,并持续较长的时间,质粒在体内存留的最长时间与 Schubert et al (1997)^[4]研究结果有所差异,可能与载体系统、载体大小及给药数量差异有关。实验表明外源质粒能够抵抗胃肠道核酸酶的降解,肠道对外源质粒 DNA 并不是不可逾越的屏障。

进入细胞的外源质粒一部分以游离体形式存在于胞质中,一部分进入细胞核整合入宿主染色体中^[7]。我们发现微弱的外源质粒特异性条带,初步说明经胃肠道吸收后外源质粒会整合到宿主染色体基因组。Schubert et al (1997)将插入有 M13DNA 的老鼠脾细胞 DNA 重克隆至质粒载体中,也分离出 1.3 kb M13 DNA 片段, DNA 序列分析发现与该片段共价相连的 DNA 与老鼠 IgE 受体基因有 70% 的同源性。但是与 PCR 敏感性参照比较,整合的外源质粒低于 25 拷贝。如果以 30 个拷贝数来进行计算,也就是外源质粒进入宿主细胞后,在 1 μ g 细胞染色体 DNA 中引起基因突变的最大可能性为 30。小鼠的 1 个细胞染色体组大约含有 3×10^9 个碱基对,重量为 6 g,那么 1 μ g 的染色体组大约含有 1.5×10^5 的染色体组。实际上,哺乳动物染色体组中的基因是不断地发生着自发突变,只要其发生的概率对于每一个基因来说不超过 10^{-6} ,就不会对哺乳动物的健康造成影响。由于每个细胞染色体组中大约含有 7.5×10^4 个基因,那么 1.5×10^5 个细胞染色体组就含有 11.25×10^9 个基因,如果外源 DNA 在 1.5×10^5 个细胞染色体中造成 30 次突变,那么他的突变概率就是 2.7×10^{-9} 。根据计算的结果和正常所容许的基因突变概率 10^{-6} 相比,外源质粒 DNA 经胃肠道吸收后可能引起的基因突变概率要比细胞的自发突变率低 2 700 倍^[16-32]。因此认为外源质粒即使有可能和细胞染色体组的 DNA 发生随机整合,对于其安全性也是不足为虑的。

外源质粒 DNA 作为大分子通过胃肠道途径摄入后被不完全降解后吸收,以碎片形式分布于全身各个组织中。外源 DNA 经肠黏膜吸收机制还不清楚,肠黏膜上的 M 细胞或淋巴细胞是否作为外源 DNA 穿透肠壁的主要通道,肠黏膜细胞上是否存在 DNA 结合蛋白介导外源 DNA 的吸收,不同的生理状态下外源 DNA 的吸收情况等还有待于深入研究。外源 DNA 经胃肠道吸收后可能整合到宿主基因组上,引起基因组突变及甲基化等

不可预见后果。因此,外源 DNA 在哺乳动物中的吸收代谢必然会影响宿主基因组的功能,从而对哺乳动物的进化产生影响。

4 参考文献

- Doerfler W, Schubert R. Uptake of foreign DNA from the environment: the gastrointestinal tract and the placenta as portals of entry. *Wien Klin Wochenschr* 1998;110:40-44
- Doerfler W. Foreign DNA in mammalian systems. Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto 2000:147-156
- Doerfler W, Remus R, Muller K, Heller H, Hohlweg U, Schubert R. The fate of foreign DNA in mammalian cells and organisms. *Dev Biol (Basel)* 2001;106:89-97
- Schubert R, Renz D, Schmitz B, Doerfler W. Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:961-966
- Schubert R, Hohlweg U, Renz D, Doerfler W. On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission to the fetus. *Mol Gen Genet* 1998;259:569-576
- Hohlweg U, Doerfler W. On the fate of plant or other foreign genes upon the uptake in food or after intramuscular injection in mice. *Mol Genet Genomics* 2001;265:225-233
- Palka-Santini M, Schwarz-Herzke B, Hosel M, Renz D, Auerbach S, Brondke H, Doerfler W. The gastrointestinal tract as the portal of entry for foreign macromolecules: fate of DNA and proteins. *Mol Genet Genomics* 2003;270:201-215
- Doerfler W, Hohlweg U, Muller K, Remus R, Heller H, Hertz J. Foreign DNA integration-perturbations of the genome-oncogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2001;945:276-288
- Muller K, Heller H, Doerfler W. Foreign DNA integration. Genome-wide perturbations of methylation and transcription in the recipient genomes. *J Biol Chem* 2001;276:14271-14278
- Remus R, Kammer C, Heller H, Schmitz B, Schell G, Doerfler W. Insertion of foreign DNA into an established mammalian genome can alter the methylation of cellular DNA sequences. *J Virol* 1999;73:1010-1022
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001:26-50
- Ren JM, Zou QM, Wang FK, He Q, Chen W, Zen WK. PELA microspheres loaded *H pylori* lysates and their mucosal immune response. *World J Gastroenterol* 2002;8:1098-1102
- Cen XQ, Zhang WD, Song YG, Zhou DY. Induction of apoptosis of lymphocytes in rat mucosal immune system. *World J Gastroenterol* 1998;4:19-23
- Beever DE, Kemp CF. Safety issues associated with the DNA in animal feed derived from genetically modified crops. A review of scientific and regulatory procedures. *Nutri Abstr Rev* 2000;70:175-182
- Kang KK, Choi SM, Choi JH, Lee DS, Kim CY, Ahn BO, Kim BM, Kim WB. Safety evaluation of GX-12, a new HIV therapeutic vaccine: investigation of integration into the host genome and expression in the reproductive organs. *Intervirology* 2003;46:270-276
- Haworth R, Pilling AM. The PCR assay in the preclinical safety evaluation of nucleic acid medicines. *Hum Exp Toxicol* 2000;19:267-276
- Ledwith BJ, Manam S, Troilo PJ, Barnum AB, Pauley CJ, Griffiths TG 2nd, Harper LB, Schock HB, Zhang H, Faris JE, Way PA, Beare CM, Bagdon WJ, Nichols WW. Plasmid DNA vaccines: assay for integration into host genomic DNA. *Dev Biol (Basel)* 2000;104:33-43
- Ledwith BJ, Manam S, Troilo PJ, Barnum AB, Pauley CJ, Griffiths TG 2nd, Harper LB, Beare CM, Bagdon WJ, Nichols WW. Plasmid DNA vaccines: investigation of integration into

- host cellular DNA following intramuscular injection in mice. *Intervirology* 2000;43:258-272
- 19 Manam S, Ledwith BJ, Barnum AB, Troilo PJ, Pauley CJ, Harper LB, Griffiths TG 2nd, Niu Z, Denisova L, Follmer TT, Pacchione SJ, Wang Z, Beare CM, Bagdon WJ, Nichols WW. Plasmid DNA vaccines: tissue distribution and effects of DNA sequence, adjuvants and delivery method on integration into host DNA. *Intervirology* 2000;43:273-281
- 20 Wang Z, Troilo PJ, Wang X, Griffiths TG, Pacchione SJ, Barnum AB, Harper LB, Pauley CJ, Niu Z, Denisova L, Follmer TT, Rizzuto G, Ciliberto G, Fattori E, Monica NL, Manam S, Ledwith BJ. Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Ther* 2004;15(in press)
- 21 Vandegraaff N, Kumar R, Burrell CJ, Li P. Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV) DNA integration in acutely infected cells as determined using a novel assay for detection of integrated HIV DNA. *J Virol* 2001;75:11253-11260
- 22 Lin NT, Chang RY, Lee SJ, Tseng YH. Plasmids carrying cloned fragments of RF DNA from the filamentous phage (phi)Lf can be integrated into the host chromosome via site-specific integration and homologous recombination. *Mol Genet Genomics* 2001;266:425-435
- 23 Oh YK, Kim JP, Hwang TS, Ko JJ, Kim JM, Yang JS, Kim CK. Nasal absorption and biodistribution of plasmid DNA: an alternative route of DNA vaccine delivery. *Vaccine* 2001;19:4519-4525
- 24 Imboden M, Shi F, Pugh TD, Freud AG, Thom NJ, Hank JA, Hao Z, Staelin ST, Sondel PM, Mahvi DM. Safety of interleukin-12 gene therapy against cancer: a murine biodistribution and toxicity study. *Hum Gene Ther* 2003;14:1037-1048
- 25 Mooney DA, Liljestrom P, Todd D, Atkins GJ. Semliki Forest virus-based vaccines: persistence, distribution and pathological analysis in two animal systems. *Vaccine* 2001;19:1978-1988
- 26 Lunsford L, McKeever U, Eckstein V, Hedley ML. Tissue distribution and persistence in mice of plasmid DNA encapsulated in a PLGA-based microsphere delivery vehicle. *J Drug Target* 2000;8:39-50
- 27 Parker SE, Monteith D, Horton H, Hof R, Hernandez P, Vilalta A, Hartikka J, Hobart P, Bentley CE, Chang A, Hedstrom R, Rogers WO, Kumar S, Hoffman SL, Norman JA. Safety of a GM-CSF adjuvant-plasmid DNA malaria vaccine. *Gene Ther* 2001;8:1011-1023
- 28 Bureau MF, Naimi S, Torero Ibad R, Seguin J, Georger C, Arnould E, Maton L, Blanche F, Delaere P, Scherman D. Intramuscular plasmid DNA electrotransfer. Biodistribution and degradation. *Biochim Biophys Acta* 2004;1676:138-148
- 29 Hulse DJ, Romero CH. Fate of plasmid DNA encoding infectious bursal disease virus VP2 capsid protein gene after injection into the pectoralis muscle of the chicken. *Poult Sci* 2002;81:213-216
- 30 Imboden M, Shi F, Pugh TD, Freud AG, Thom NJ, Hank JA, Hao Z, Staelin ST, Sondel PM, Mahvi DM. Safety of interleukin-12 gene therapy against cancer: a murine biodistribution and toxicity study. *Hum Gene Ther* 2003;14:1037-1048
- 31 Dupuis M, Denis-Mize K, Woo C, Goldbeck C, Selby MJ, Chen M, Otten GR, Ulmer JB, Donnelly JJ, Ott G, McDonald DM. Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice. *J Immunol* 2000;165:2850-2858
- 32 Al-Qarawi AA, Ali BH, Al-Mougy SA, Mousa HM. Gastrointestinal transit in mice treated with various extracts of date (*Phoenix dactylifera* L.). *Food Chem Toxicol* 2003;41:37-39

World Journal of Gastroenterology 电子版

《World Journal of Gastroenterology, WJG》网(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>)于2003-04-15开通, 截止2003-10-26 点击率已达 452392 人次. WJG 电子版由以下7个栏目组成. (1) 期刊介绍: 编委成员, 编委成员简介, 编辑, 检索系统收录, 影响因子. (2) 出版: 出版, 版权, 征订. (3) 投稿: 投稿细则、文献综述、研究论文、研究快报、病例报告等的书写格式. (4) 新闻: IM 收录期刊、JCR 报道的影响因子. (5) 投稿查询: 提交用户名和密码, 可查询到稿件的全部流程, 共计28项. (6) 电子期刊: 现刊和过刊(1995-2003), 全刊索引. WJG 电子期刊功能包括 HTM、PDF、摘要、相关性文献、被引频次、点击次数、下载次数、评论等. (7) 参考文献链接: WJG 对刊出论文的全部参考文献与原文的首页进行校对, 保证了每条参考文献的作者、题名、年、卷号、页码、PMID 等内容正确性, 并与 PubMed 和 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp> 中的摘要及全文进行链接, 提高了参考文献的引用准确性, 也方便了读者查阅参考文献的全文及摘要.