

幽门螺杆菌5种候选疫苗抗原基因的克隆、表达及抗原性的鉴定

宁云山, 李妍, 龙敏, 董文其, 李明

宁云山, 李妍, 龙敏, 董文其, 李明, 南方医科大学生物技术学院 广东省广州市 510515

宁云山, 2001年第一军医大学博士, 副教授, 主要从事蛋白质与抗体工程研究。

通讯作者: 李明, 510515, 广东省广州市同和, 南方医科大学生物技术学院. mingli@fimmu.com

电话: 020-61648550 传真: 020-61648550

收稿日期: 2006-03-08 接受日期: 2006-05-24

Cloning, expression and antigenicity identification of five candidate vaccine antigen genes of human *Helicobacter pylori*

Yun-Shan Ning, Yan Li, Min Long, Wen-Qi Dong, Ming Li

Yun-Shan Ning, Yan Li, Min Long, Wen-Qi Dong, Ming Li, School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Correspondence to: Dr. Ming li, School of Biotechnology, Southern Medical University, Tonghe, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. mingli@fimmu.com

Received: 2006-03-08 Accepted: 2006-05-24

Abstract

AIM: To construct a recombinant plasmid containing genes encoding Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB from *H pylori*, express it in *E.coli* and explore the antigenicity.

METHODS: The genes, encoding Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, and UreaseB, were amplified from *H pylori* chromosomal DNA by polymerase chain reaction (PCR), and then T-A was cloned and sequenced. The target genes cloned into pGEX-4T-1 fusion expression vector were expressed in *E.coli* and purified by GST-affinity chromatography. The purified products were used to identify 29 strains of mouse monoclonal antibodies (mAbs) against *H pylori*, and the antigenicity of the products was analyzed by Western blot with serum of *H pylori*-infected patients.

RESULTS: Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, and UreaseB fragments were 528 bp, 351 bp, 675 bp, 855 bp, and 1704 bp in length, respectively (Gen-

Bank submission No. DQ106902, DQ141574, DQ141577, DQ141575, and DQ141576, respectively), and the nucleotide homology was 95%-99% with other *H pylori* strains. Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, and UreaseB fusion protein were expressed with molecular weights of 48 000, 41 000, 52 000, 6 0000, and 91 000 Da in *E.coli* respectively. Of 29 anti-*H pylori* mouse mAbs, there were 4, 5, 5, 1, and 6 strains against Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, and UreaseB. Western blot proved that five recombinant proteins were specifically recognized by the serum of *H pylori*-infected patients.

CONCLUSION: Five recombinant proteins, Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, and UreaseB, preserve original antigenicity.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Candidate vaccine antigen; Cloning; Gene expression; Antigenicity

Ning YS, Li Y, Long M, Dong WQ, Li M. Cloning, expression and antigenicity identification of five candidate vaccine antigen genes of human *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(26):2605-2609

摘要

目的: 构建含人*H pylori* 5种候选疫苗抗原Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB的编码基因的重组质粒并研究其抗原性。

方法: 应用PCR技术从*H pylori*染色体中扩增编码Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB的基因片段, 将其T-A克隆和测序, 并与GenBank公布的其他*H pylori*菌株基因序列比较, 再将目的基因克隆至融合表达载体pGEX-4T-1上中进行表达, 用GST亲和层析对其进行纯化, 纯化产物用于对29株小鼠抗*H pylori*-全菌单克隆抗体(mAb)的鉴定及与*H pylori*感染患者血清进行Western blot分析。

结果: 扩增的Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB基因全长分别为528 bp, 351 bp, 675 bp, 855 bp, 1704 bp (GenBank登录号

背景资料

人自然感染*H pylori*后, 宿主的免疫反应不能有效清除病原菌, 目前临床上常采用联合应用质子泵抑制剂和抗生素的“三联”疗法来控制*H pylori*的感染。然而, 药物治疗有很大的局限性。随着*H pylori*全基因序列及功能蛋白的揭示, 用免疫方法来防治*H pylori*的感染成为可能, 疫苗的研制逐渐成为研究热点。

■研发前沿

Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, Urease B等主要保护性抗原都可作为单独抗原使用,在动物实验中均表现出一定的免疫保护作用,但其保护性具有一定的局限性,因此发展含有两种或两种以上主要保护性抗原组成的多价重组疫苗已成为*H pylori*疫苗研制的方向。

分别为DQ106902, DQ141574, DQ141577, DQ141575, DQ141576),与GenBank公布的其他菌株的核酸序列的同源性在95%-99%,表达Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB融合蛋白的相对分子质量分别约为48 000, 41 000, 52 000, 60 000, 91 000 Da, 29株小鼠抗*H pylori*全菌mAb中针对Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB抗原的分别为4, 5, 5, 1, 6株, 5种抗原的纯化产物均可被*H pylori*感染患者血清特异性识别。

结论: 重组表达的Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB均具有较好的抗原性。

关键词: 幽门螺杆菌; 候选疫苗抗原; 克隆; 基因表达; 抗原性

宁云山, 李妍, 龙敏, 董文其, 李明. 幽门螺杆菌5种候选疫苗抗原基因的克隆、表达及抗原性的鉴定. 世界华人消化杂志 2006;14(26):2605-2609

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2605.asp>

0 引言

1982年澳大利亚罗宾·沃伦和巴里·马歇尔发现一种长期定植于人体胃黏膜的致病菌——幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), 并因此获得了2005年诺贝尔医学奖。大量研究证实, 自然感染*H pylori*后机体的免疫反应不能清除细菌, *H pylori*的长期感染是慢性消化道疾病如B型(胃窦)胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴组织(MALT)胃癌等发生、发展的重要原因^[1]。目前在一些发达国家, *H pylori*的感染率虽然有所下降, 但仍存在大量感染者; 而在发展中国家, *H pylori*的感染状况则更为严重。目前临床上常采用抗生素治疗*H pylori*的感染, 虽可在一定程度上治愈感染, 但存在患者的依从性差、耐药菌株产生和反复感染等问题。大量的实验证明, 免疫接种可预防甚至治疗*H pylori*的感染, 所以*H pylori*疫苗的研究具有深远的发展前景。 *H pylori*的抗原成分很多, 目前已发现*H pylori*单一抗原的保护率几乎均低于80%, 2种或2种以上*H pylori*抗原组合的疫苗有理想的保护效果^[2]。我们选取尿素酶A和B (UreaseA, B)、热休克蛋白A (heat shock protein, HspA)、脂蛋白(lipoprotein, Lpp20)、细胞毒素相关基因蛋白(cytotoxin-associated gene A, CagA)等作为研究对象, 利用基因工程技术构建了这5种基因的重组质粒, 并进行了测序和表达, 为*H pylori*疫苗和诊断抗原

的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 *H pylori*感染患者血清(尿素酶实验阳性)和健康正常人血清(尿素酶实验阴性)均来自南方医科大学附属南方医院消化科。 *H pylori*标准株NCTC11639由本校微生物实验室保存; 菌株*E.coli* DH5 α , TOP10和表达载体pGEX-4T-1由本室保存。Taq DNA聚合酶、pMD18-T载体、限制性内切酶、T4连接酶、DNA Marker及蛋白Marker均为TaKaRa公司产品。引物设计参考GenBank收录的*H pylori*国际标准株26695的基因序列, 应用Primer 5.0设计目的基因的PCR引物如下: Lpp20:

P1 5'-GAATTCATGAAAAATCAAGTTAAAAA-3'(EcoR I) P2 5'-GTCGACCTACTTTTTTAACCATGCC-3'(Sal I); HspA: P3 5'-GGATCCAAGTTTCAACCATTA GGA-3'(BamH I) P4 5'-GAATTCCTTAGTGTTTTTTGTGATC-3'(EcoR I); UreaseA: P5 5'-GGATCCAAGTTTCAACCATTA AGGA-3'(BamH I) P6 5'-GAATTCCTTAGTGTTTTTTGTGATC-3'(EcoR I); CagA: P7 5'-GGATCCGGAGAAACAATGA CTAAC-3'(BamH I) P8 5'-GTCGACTTCCATATCGCCAAGA-3'(Sal I); UreaseB: P9 5'-GAATTCAAA AAGATTAGCAG -3'(EcoR I) P10 5'-GTCGACGAAAATGCTAAAGA-3'(Sal I), 在每对引物的上、下游引进合适的酶切位点(划线处), 引物由上海博亚和大连TaKaRa公司合成。细菌基因组DNA提取试剂盒、质粒提取试剂盒及切胶回收试剂盒均为TaKaRa公司产品。PVDF电转印膜为Bio-Rad公司产品。HRP-标记的羊抗鼠或羊抗人IgG及链亲霉素标记的二抗为Gibco BRL公司产品。29株小鼠抗*H pylori*全菌mAb由本室制备^[3]。

1.2 方法

1.2.1 重组表达质粒的构建和鉴定 从固体培养基上刮取适量生长状态良好的*H pylori*菌落, 置于PBS缓冲液中, DNA的提取参照细菌基因组DNA提取试剂盒说明进行。用Taq DNA聚合酶, 以提取的*H pylori*染色体DNA为模板, 按照常规PCR条件进行扩增, 60 μ L反应体积。反应条件如下: 预变性95 $^{\circ}$ C 5 min, 变性95 $^{\circ}$ C 60 s, 退火温度Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB分别为58 $^{\circ}$ C, 50 $^{\circ}$ C, 50 $^{\circ}$ C, 54 $^{\circ}$ C, 52 $^{\circ}$ C, 时间50 s, 延伸72 $^{\circ}$ C 60 s, 共进行35个循环, 最后一个循环结束后72 $^{\circ}$ C再延伸6 min, 反应产物于10 g/L琼脂糖

■相关报道

第三军医大学邹全明教授成功研制的国家I类新药——口服重组*H pylori*疫苗, 就是分离、克隆*H pylori*保护性抗原亚单位UreB及HspA基因, 将其融合构建成为LTB为分子内黏膜佐剂的基因工程疫苗候选株, 已进入I、II期临床实验, 这与本文的研究宗旨相符。

凝胶电泳进行分析. 将目的基因与pMD18-T载体进行连接, 以连接产物转化到*E.coli* DH5 α 感受态中. 挑取单个菌落, 37 $^{\circ}$ C, 220 r/min摇过夜, 提取质粒, 进行双酶切鉴定, 将鉴定正确的重组质粒送上海博亚公司进行测序. 重组目的基因/pMD18-T进行双酶切, 表达载体pGEX-4T-1也用相同的酶进行双酶切. 将切胶纯化的目的基因和表达载体按4:1(摩尔数)用T4 DNA连接酶进行连接, 反应体积10 μ L, 于16 $^{\circ}$ C连接过夜. 将连接产物转化到*E.coli* TOP10感受态中, 涂于含氨苄青霉素(100 mg/L)LB固体培养基平皿中. 挑取单个菌落, 37 $^{\circ}$ C, 220 r/min摇过夜, 提取质粒, 进行双酶切鉴定.

1.2.2 目的基因的表达及产物的纯化 将鉴定正确的阳性克隆工程菌接种到含氨苄青霉素(100 mg/L)的LB液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 220 r/min摇过夜菌. 次日, 按1%接种到含氨苄青霉素(100 mg/L)的LB液体培养基中, 当A₆₀₀ = 0.7时, 加入1 mol/L的IPTG至终浓度为1 mmol/L, 诱导4 h后收菌, 进行100 g/L SDS-PAGE分析. 表达产物超声破菌后, 在上清和沉淀中都存在目的蛋白, 取上清进行实验. 装Glutathione Sepharose 4B亲和层析柱(1.0 cm \times 20 cm), 用1 \times PBS (pH 7.2-7.4)平衡后, 上样超声破菌后的上清, 流速为1 mL/min, 再以PBS平衡至基线, 用10 mmol/L谷胱甘肽洗脱, 收集各蛋白峰进行SDS-PAGE分析.

1.2.3 ELISA法鉴定抗*H pylori*鼠mAb 将纯化后的5种蛋白分别包被酶标板(5 mg/L), 依次加入本室制备的29株抗*H pylori*鼠mAb及HRP-标记的羊抗鼠IgG, TMB底物显色, 用酶标仪于波长450 nm测定吸光度(A)值.

1.2.4 重组抗原的Western blot分析 将纯化后的5种蛋白进行SDS-PAGE, 然后将凝胶上的蛋白转移至NC膜上, 依次滴加健康正常人血清、*H pylori*感染患者血清进行反应, 二抗为HRP-标记的羊抗人IgG, 每步均经温育和洗涤. 暗室内将杂交后NC膜放入显色盒内, 加上混合好的显色液2 mL, 约1 min, 出现明显的蛋白带者为阳性.

2 结果

2.1 重组表达质粒的构建和鉴定 琼脂糖凝胶电泳分析, PCR扩增目的基因DNA片段的大小同预计的结果相符(图1). 重组目的基因/pMD18-T质粒用双脱氧核苷酸法测序后分析, Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB基因全长分别528, 351, 675, 855, 1704 bp, 与GenBank上公布

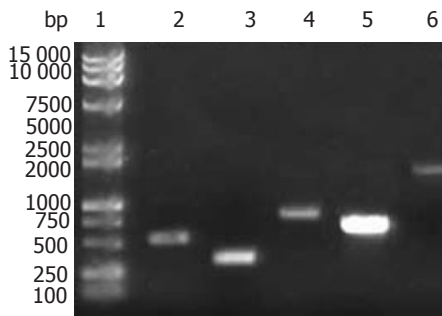


图1 琼脂糖凝胶电泳分析PCR扩增的目的基因. 1: DNA Marker; 2: Lpp20; 3: HspA; 4: CagA; 5: UreaseA; 6: UreaseB.

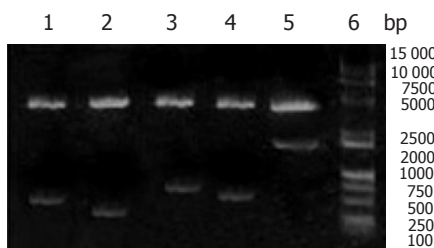


图2 重组表达质粒的双酶切鉴定. 1: Lpp20/pGEX-4T-1(*EcoR* I和*Sal* I); 2 HspA/pGEX-4T-1(*Bam*H I和*EcoR* I); 3: CagA/pGEX-4T-1(*Bam*H I和*Sal* I); 4 UreaseA/pGEX-4T-1(*Bam*H I和*EcoR* I); 5: UreaseB/pGEX-4T-1(*EcoR* I和*Sal* I); 6 DNA Marker.

的其他菌株核酸序列相比, 同源性为95%-99%, 在GenBank上登录这些序列, 登录号分别为DQ106902, DQ141574, DQ141577, DQ141575, DQ141576. 将重组表达质粒用相应的双酶切进行鉴定, 切出大约5000 bp表达载体和目的基因片段, 同预期的结果相符(图2).

2.2 目的基因的表达及产物的纯化 将含目的基因/pGEX-4T-1的工程菌在IPTG的诱导下在大肠杆菌中表达, 表达产物经SDS-PAGE分析, Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB分别表达分子质量约为48 000, 41 000, 52 000, 60 000, 91 000 kDa的融合蛋白(图3). 将表达产物超声破菌后, 上清和沉淀中都有目的蛋白的存在, 取上清进行亲和层析纯化. 纯化后的目的蛋白进行SDS-PAGE分析, 纯度均达到90%以上(图4).

2.3 ELISA鉴定抗*H pylori*鼠mAb 应用ELISA法鉴定29株小鼠抗*H pylori*全菌mAb, 针对Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB抗原的mAb分别为4, 5, 5, 1, 6株, 说明重组目的抗原具有很好的抗原性.

2.4 重组目的抗原与*H pylori*感染者血清的反应性 Western blot结果显示, 5种抗原均与*H pylori*感染患者血清有特异性反应, 反应条带与预期大小一致(图5), 而与健康正常人血清没有反应.

■创新盘点

本文从*H pylori*标准株NCTC11639中获取Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB基因, 登录到GenBank上, 这是关于NCTC11639菌株这些基因在GenBank上的首次登录, 与GenBank上公布的其他*H pylori*菌株(如26695, J99)相应的核酸序列相比具有高度的同源性.

■名词解释

亲和层析(affinity chromatography): 利用共价连接有特异配体的层析介质分离蛋白质混合物中能特异结合配体的目的蛋白或其他分子的层析技术。

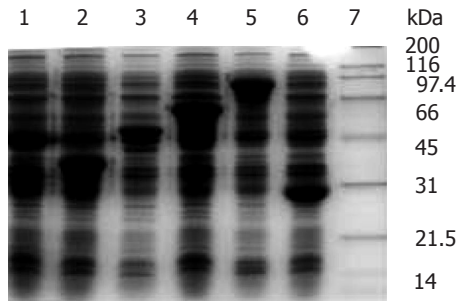


图 3 SDS-PAGE分析目的基因在大肠杆菌中的表达产物。1: Lpp20/pGEX-4T-1; 2: HspA/pGEX-4T-1; 3: UreaseA/pGEX-4T-1; 4: CagA/pGEX-4T-1; 5: UreaseB/pGEX-4T-1; 6: GEX-4T-1; 7: protein Marker。

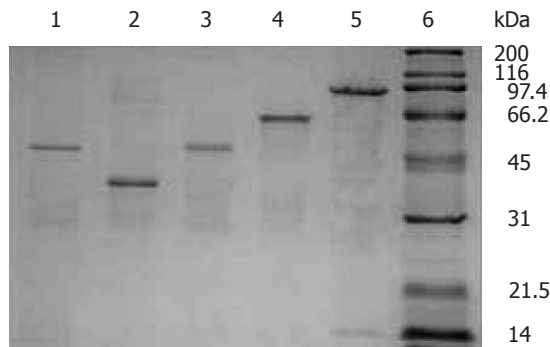


图 4 SDS-PAGE分析纯化后的蛋白。1: Lpp20; 2: HspA; 3: UreaseA; 4: CagA; 5: UreaseB; 6: protein Marker。

3 讨论

从幽门螺杆菌疫苗的研究进展上看,理想的疫苗候选抗原应该具有特异性、保守性、低毒性、能够定位于病原的表面等特征。Lpp20蛋白是定位于*H pylori*外膜上的一种高度保守的脂蛋白,将经*H pylori*全菌蛋白免疫家兔制备的抗血清,用于与细菌的蛋白组分进行反应时,发现Lpp20蛋白是抗体识别的主要抗原组分^[4]。将Lpp20经口免疫小鼠,能诱导出特异性的IgG抗体的产生。将这种抗体的杂交瘤细胞回输到小鼠体内后,能显著减少细菌的感染量,表明Lpp20是一种理想的疫苗候选抗原^[5]。HspA是*H pylori*共有的抗原成分,在不同的*H pylori*菌株间氨基酸序列高度保守,且HspA位于细菌表面,易被宿主识别,与*H pylori*诱导的胃黏膜炎症密切相关^[7],HspA诱发机体产生保护性免疫反应也已得到证实^[6]。CagA基因和CagA蛋白是*H pylori*毒力菌株的基因型和表型的标志。I型(高毒株)分泌的CagA蛋白与消化性溃疡、萎缩性胃炎及胃癌的发生密切相关^[7]。另外,CagA还具有良好的免疫保护性,在小鼠体内已证实可以预防和根治*H pylori*的感染,因此可作为研制

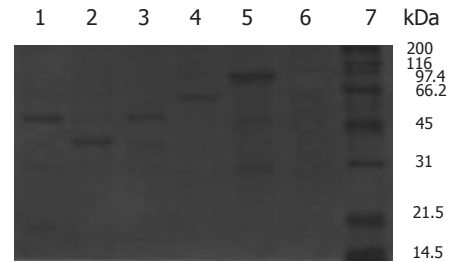


图 5 免疫印迹分析。1: Lpp20; 2: HspA; 3: UreaseA; 4: CagA; 5: UreaseB; 6: health serum; 7: protein Marker。

*H pylori*疫苗的候选抗原^[8]。Urease是*H pylori*最为保守和最为确定的一种保护性抗原成分,他由A, B 2个亚单位组成,以B亚单位的免疫反应性最强,能引起*H pylori*感染患者血清中抗该菌的IgG和IgA显著升高^[9]。应用细菌的超声粉碎抗原、纯化UreaseB作为抗原免疫动物取得了较好的免疫预防和治疗效果^[10]。从*H pylori*菌体中分离各种抗原十分困难,我们采用PCR方法从*H pylori*标准株NCTC11639中获取Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB基因,登录到GenBank上(登录号为DQ106902, DQ141574, DQ141577, DQ141575, DQ141576),与GenBank上公布的其他*H pylori*菌株相应的核酸序列相比具有高度的同源性。我们首先将基因进行T-A克隆,可克服直接酶切PCR产物效率不高的弊端。在此基础上,再将基因克隆入pGEX-4T-1融合表达的载体中,由于pGEX-4T-1含有GST的融合表达标签,所以融合表达的各种蛋白可用GST亲和层析进行纯化。纯化后的各种蛋白用于对29株小鼠抗*H pylori*全菌mAb筛选,筛选出针对Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB抗原的抗体分别为4, 5, 5, 1, 6株,Western blot分析重组表达的各种蛋白可与*H pylori*感染的患者血清发生特异性反应,可见重组蛋白具有很好的抗原性。

4 参考文献

- 1 Losonsky GA, Kotloff KL, Walker RI. B cell responses in gastric antrum and duodenum following oral inactivated *Helicobacter pylori* whole cell (HWC) vaccine and LT(R192G) in *H pylori* seronegative individuals. *Vaccine* 2003; 21: 562-550
- 2 Bumann D, Jungblut PR, Meyer TF. *Helicobacter pylori* vaccine development based on combined subproteome analysis. *Proteomics* 2004; 4: 2843-2848
- 3 李妍,宁云山,洪燕华,刘宜楚,罗军,龙敏,董文其,李明. 抗幽门螺杆菌单克隆抗体的制备与鉴定. *南方医科大学学报* 2006; 26: 425-427
- 4 Kostrzynska M, O'Toole PW, Taylor DE, Trust TJ. Molecular characterization of a conserved 20-kilodalton membrane-associated lipoprotein

- antigen of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 1994; 176: 5938-5948
- 5 Keenan J, Oliaro J, Domigan N, Potter H, Aitken G, Allardyce R, Roake J. Immune response to an 18-kilodalton outer membrane antigen identifies lipoprotein 20 as a *Helicobacter pylori* vaccine candidate. *Infect Immun* 2000; 68: 3337-3343
 - 6 Marchetti M, Arico B, Burroni D, Figura N, Rappuoli R, Ghiara P. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 1995; 267: 1655-1658
 - 7 Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995; 55: 2111-2115
 - 8 Webb PM, Crabtree JE, Forman D. Gastric cancer, cytotoxin-associated gene A-positive *Helicobacter pylori*, and serum pepsinogens: an international study. The Eurogst Study Group. *Gastroenterology* 1999; 116: 269-276
 - 9 Perez-Perez GI, Cutler AF, Blaser MJ. Value of serology as a noninvasive method for evaluating the efficacy of treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 1038-1043
 - 10 Gomez-Duarte OG, Lucas B, Yan ZX, Panthel K, Haas R, Meyer TF. Protection of mice against gastric colonization by *Helicobacter pylori* by single oral dose immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* producing urease subunits A and B. *Vaccine* 1998; 16: 460-471

■同行评价
幽门螺杆菌与消化性溃疡、胃癌等疾病的发病关系密切, 如何有效的杀灭体内*H pylori*, 是研究的热点. 本研究构建了5种*H pylori*候选疫苗抗原, 并检测了这些疫苗的抗原性, 为今后*H pylori*检测试剂和疫苗的研究奠定基础. 该研究选题新颖, 设计合理, 结果可靠.

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2004年度《世界华人消化杂志》、《World Journal of Gastroenterology》的影响因子在1608种中国科技论文统计源期刊中的排位

本刊讯 根据由中国科学技术信息研究所完成的“2004年度中国科技论文统计与分析结果”, 在收录的1608种中国科技论文统计源期刊中, 总被引频次平均值433.61次/刊, 影响因子平均值0.386.

《世界华人消化杂志》的总被引频次为3353, 位居1608种中国科技论文统计源期刊的第8位, 内科医学类, 28种期刊的第2位. 《世界华人消化杂志》的影响因子为1.769, 位居1608种中国科技论文统计源期刊的第14位, 内科医学类28种期刊的第2位. 《世界华人消化杂志》的即年指标0.211, 他引总引比0.30, 地区分布数28, 基金论文比0.43, 国际论文比0.01.

《World Journal of Gastroenterology》的总被引频次为4127, 位居1608种中国科技论文统计源期刊的第3位, 内科医学类, 28种期刊的第1位. 《World Journal of Gastroenterology》的影响因子为2.654, 位居1608种中国科技论文统计源期刊的第4位, 内科医学类28种期刊的第1位. 《World Journal of Gastroenterology》的即年指标0.399, 他引总引比0.58, 地区分布数27, 基金论文比0.52, 国际论文比0.26.