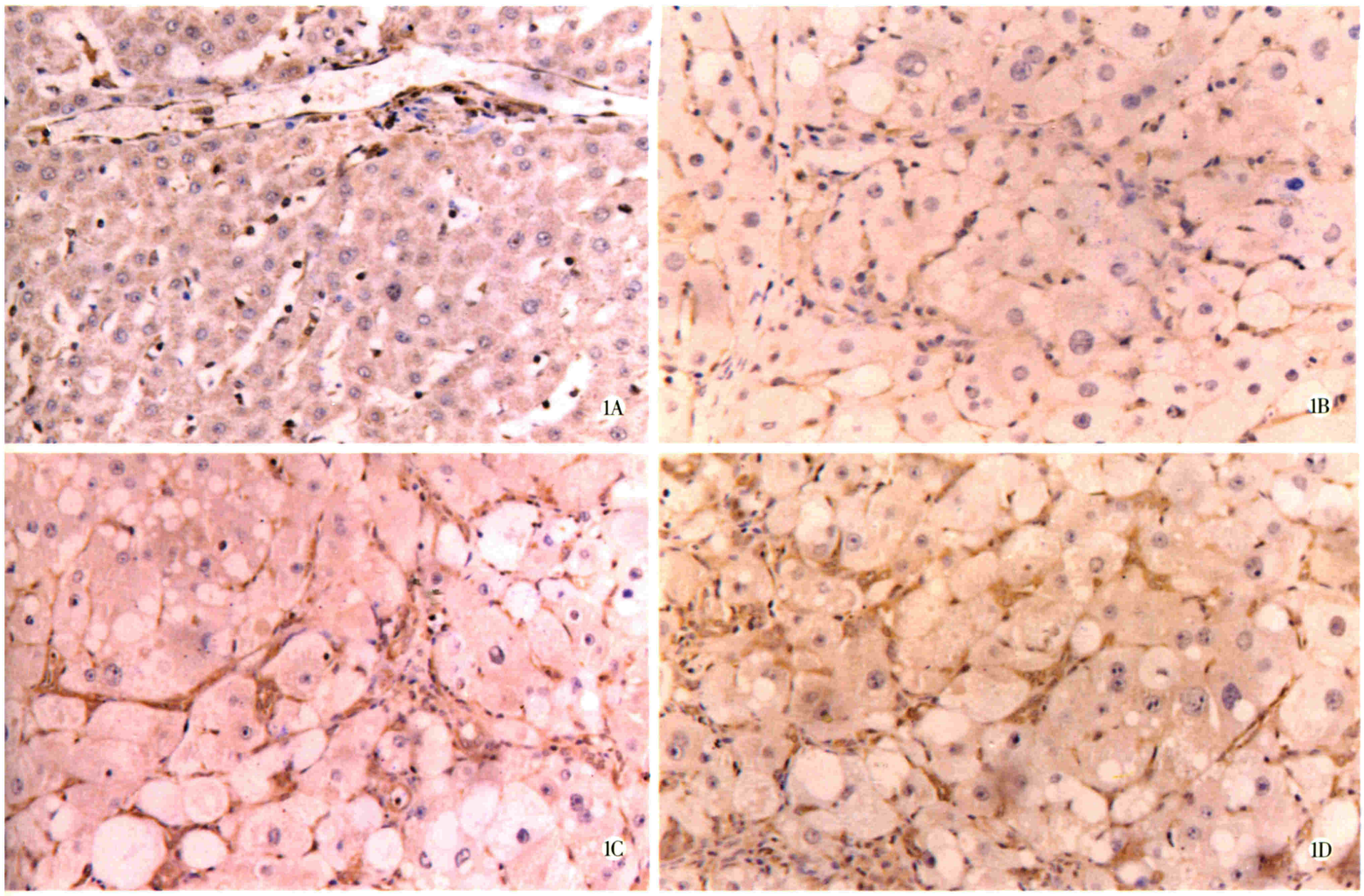
ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003年6月15日 第11卷 第6期 (Volume 11 Number 6)



6/2003

ISSN 1009-3079

名誉总编辑
潘伯荣
总编辑
马连生

World Journal of Gastroenterology® 被 SCI®-E, Research Alert®, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports® Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 1.445. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目　次 ●　2003 年 6 月 15 日　第 11 卷　第 6 期（总第 110 期）

述　评

689 肝脏胶原蛋白检测进展与评析 刘成海

病毒性肝炎

693 甲型肝炎减毒活疫苗(LA-1 株)大规模免疫长期效果观察 龚健,李荣成,徐志一,江世平,罗东,杨进业,李艳萍,陈修荣,黄贵彪,凌文武,韦光武,汪萱怡

697 HCV-Fc 融合基因疫苗真核表达载体的构建及表达 冯志华,王全楚,周永兴,郝春秋,聂青和

701 胸腺肽 α1 对慢性乙型肝炎患者免疫系统的影响 段国荣,聂青和,周永兴,王全楚,田长印,刘拉羊,薛红安

705 蛋白激酶 C 对肾小球前小动脉平滑肌细胞 I 型 IP_3 受体表达影响 王静艳,刘沛,韩峰

肝　癌

708 抗肝癌单链免疫毒素基因修饰的 PBMCs 在动物体内的抑瘤作用 程虹,刘彦仿,张惠中,沈万安,张菊,张静

712 经皮穿刺氩氦刀冷冻治疗肝癌 31 例 钱国军,陈汉,吴孟超

716 大鼠肝细胞癌形成过程中 MMP-2mRNA 的表达及应用 BB-94 的影响 张志,方石岗,高毅,蒋泽生,孙尔维

基础研究

719 西安酒精性肝病流行病学 鲁晓岚,陶明,罗金燕,耿燕,赵平,赵红莉

723 蛋白激酶 C 在肝细胞缺氧预处理中的作用 单毓强,高毅,王瑜,潘明新

726 肝硬化不同病期 ET-1,NO 对离体肝脏血流动力学的调节作用 姚冬梅,姚希贤,杨川杰,冯志杰,房红梅,高军萍

730 大鼠肝纤维化中细胞外信号调节激酶的作用 梁增文,张国,王天才

733 环氧合酶 -2 反义核酸对人胆管癌细胞增生的影响 吴高松,武小勇,邹声泉,裘法祖

737 ONO-3403 对胆囊收缩素刺激的大鼠胰腺外分泌的影响 陈少夫,刘维新,山本光勝,大槻眞

741 内皮抑素 - 可溶性血管内皮细胞生长抑制因子融合基因重组腺病毒的包装与鉴定 李喆,潘欣,潘卫,曹贵松,闻兆章,方国恩,戚中田,毕建成,华积德

745 激活素 A 对肝星状细胞细胞外基质合成的影响 刘清华,李定国,黄新,尤汉宁,潘勤,徐雷鸣,徐芹芳,陆汉明

749 脾静脉结扎诱导继发性脾功能亢进犬动物模型的评价 刘全达,马宽生,何振平,丁钧,董家鸿

753 IL-6 与整合素家族细胞黏附分子在大鼠急性坏死性胰腺炎合并多器官损伤模型中的表达 孙威,张俊东,赵滢,赵宇,王强

临床研究

756 老年消化道多原发癌的早期诊断及综合治疗 蔡昌豪,吴本俨,吴道宏,邵勇,王孟薇

焦点论坛

760 进一步深化慢性乙型肝炎诊断治疗的实用性研究 李梦东,聂青和

762 慢性乙型肝炎临床分度、诊断的一些问题 周永兴

766 慢性乙型肝炎的鉴别诊断及常见并发症 聂青和

768 特殊人群乙型肝炎的临床特点及处理 罗新栋,聂青和

772 病理学检测在慢性乙型肝炎诊断治疗中的价值 郎振为

775 经皮肝脏活体穿刺活检技巧及研究进展 滕光菊,聂青和

776 乙型肝炎的实验检查及其临床意义 郝春秋,聂青和

780 慢性乙型肝炎的抗病毒治疗 程明亮,吴亚云

783 慢性乙型肝炎的免疫治疗 施光峰

785 慢性乙型肝炎的中医药治疗 申德林,王全楚,焦栓林

787 乙型肝炎病毒携带者的诊断与治疗 江家骥,朱琪

789 慢性乙型肝炎肝纤维化的诊断与治疗 蔡卫民,张彬彬

791 乙型肝炎病毒慢性感染和肝癌发生 苏勤

795 治疗性疫苗 - 慢性乙型肝炎患者的希望 王全楚,聂青和

文献综述

799 抗乙型肝炎病毒肝靶向药物制剂的研究进展 王九平,白雪帆

803 腺病毒载体的特点及其在 HCV 研究中的应用 郝春秋,冯志华,聂青和

806 HCVC 区 DNA 疫苗的研究现状 孙利,周永兴

810 病毒性肝炎基因治疗的研究和面临的挑战 贾战生,冯志华,周永兴

文献综述

815 抗HCV树突状细胞疫苗的制备及功能研究 王全楚,冯志华,周永兴
819 疫苗新概念及新型疫苗的研制 冯志华,王全楚
823 特殊状态下的逆行胰胆管造影检查术 智发朝
824 胃肠道出血的内镜诊治 陈村龙,宋于刚,周殿元
827 介入内镜学在胆胰疾病中的应用 刘思德
829 老年期消化性溃疡与恶性肿瘤溃疡、应激性溃疡的鉴别 吴保平,肖冰
831 老年人消化道急症 黄纯炽

研究快报

834 肠癌细胞BAI1基因表达的检测及其抗肿瘤作用 王志华,康熙雄,张智清,申宝忠,李莹
836 三氧化二砷对鸡胚移植胆管癌生长的抑制作用 喻智勇,王曙光,郑秀海,李昆
838 小鼠实验性肝损伤中NO的动态检测及意义 陈会松,柳利明,黄华,杨晋辉

临床经验

841 结肠黑变病25例 孙军,李岩
842 保留胰腺的脾动脉干及脾切除术在胃癌根治术中的意义 陈志新,胡建昆,张波,陈佳平,周总光
844 萎缩性胃炎临床证型分类研究 朱方石,姒健敏,王良静
846 叶酸对胃癌前细胞凋亡的影响 曹大中,刘顺英,赵建学
848 短肠综合征的远期并发症4例 周伟,江志伟,姜军,朱维铭,张佃良,李宁,黎介寿
851 幽门螺杆菌感染与慢性肝病的临床关系 焦建中,聂青和,赵春林,吴永胜,文绍先,吴群
853 内支架术与腔内近距放射治疗联合应用治疗晚期食管癌8例 申宝忠,于友涛
855 组织黏合剂Histoacryl治疗胃静脉曲张活动性出血的疗效 曾黎明,陈村龙,智发朝
856 肝病患者血清肿瘤坏死因子α水平变化 徐学刚,张美稀,董惠芳,杨协珍,金树根,陈建杰,王灵台
859 尼美舒利引起肝脏损害14例 关英,徐峰,胡莲,周甘平
861 脾脏体积、脾静脉血流及血细胞计数在门静脉高压症分期中的意义 王秀艳,游晓功,施宝民,穆庆岭,吴泰璜
863 大连地区糖尿病患者与健康成年人肠内菌群的比较 孙艳,刘波,赵静玫,王海岩,徐和利,李雪驼
865 影像学检查对肝门部胆管癌进展范围评价的临床价值 张国梁,韦斌,朱春兰,任旭
867 分离培养在*Hp*感染诊断中的重要地位 史济经,闵海阳,王青,杨慧芳,王洪涛,张振华
870 HBV感染者HBV DNA与抗原抗体标志物的关系 陈雪娟,李刚,刘淑芳,陈文思,李桂侠
871 乙型肝炎肝组织中细胞间黏附分子-1及Fas的表达及意义 张闽峰,郑瑞丹,孟家榕,郭以河,林福地
873 轮状病毒全身感染对肝胆胰的影响 姚英民,李宁,欧巧群
877 良性肝病患者血清AFP升高的临床意义 程天霞
875 胆源性胰腺炎手术治疗58例 黄建勇,马清涌,马建新
879 经皮肝穿刺胆道引流治疗外伤后胆瘘 汪邵平,霍枫,张玉新,裴世强

病例报告

840 以肠梗阻为首发表现的原发性小肠肿瘤4例 赵永玲,魏芳

编委来信

707 711 江学良

投稿细则

附1-4 世界华人消化杂志投稿细则

封面故事

730 大鼠肝纤维化中细胞外信号调节激酶的作用 梁增文,张国,王天才

世界華人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(月 刊)
创 刊 1993-01-15
改 刊 1998-01-25
出 版 2003-06-15
原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀 张金哲 黄象谦 张学庸 黄志强 赵东海 黎介寿 周殿元 刘耕陶 裘法祖 汤钊猷 王宝恩 危北海 吴孟超 吴咸中

社长总编辑 马连生
中文编辑 潘伯荣 王瑾晖
英文编辑 张建中
排 版 李少华
校 对 李天华

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001，山西省太原市双塔西街77号
E-mail:wcjd@wjgnet.com
出版 世界胃肠病学杂志社
100023，北京市2345信箱
E-mail: wcjd @ wjgnet.com
http://www.wjgnet.com
电话 (010)85381892
传真 (010)85381893
印刷 北京科信印刷厂
发行 国内 北京报刊发行局
国外 中国国际图书贸易总公司
(100044，北京399信箱)
订购 全国各地邮电局
邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023，北京市2345信箱)
电话:(010)85381892
传真:(010)85381893

2003年版权归世界胃肠病学杂志社所有

本刊已被国内外检索系统收录

美国《化学文摘(CA)》
荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》
俄罗斯《文摘杂志(PЖ)》
中国科技论文统计与分析
中国学术期刊文摘
中国中医药信息服务网
中国生物医学文献光盘数据库
《中文科技资料目录(医药卫生)》
中国生物医学期刊目次数据库
中国医学文摘外科学分册(英文版)
中国医学文摘内科学分册(英文版)

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点，除非特别声明.本刊如有印装质量问题，请向本刊编辑部调换.

ISSN 1009-3079	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
CN 14-1260/R	82-262	M 4481	每期24.00元 全年288.00元	1401004000050

采用酶标法检测健康人血清TIMP含量为164 ± 20 ng/mL，慢迁肝、慢活肝及肝硬化患者与健康人相比分别升高10 %、36 %、62 %，并发现血清TIMP与血清胶原酶活性呈负相关，与肝纤维化程度密切相关. 1999年Murawaki *et al*[4]报道健康人血清TIMP-1浓度为155 ± 17 ng/mL(酶标法)，慢迁肝、慢活肝及肝硬化患者与健康人相比分别升高18 %、35 %、63 %. Lichtinghagen *et al*[5]认为外周血白细胞MMP-2、MMP-9、TIMP-1和TIMP-2的mRNA水平与血清中蛋白浓度无关，血循环中MMP-2/TIMP-1的比值与肝纤维化程度相关. 聂青和 *et al*[6]用固相致敏红细胞黏附技术检测肝硬化患者血清TIMP-1和TIMP-2阳性率分别为73.6 %、61.2 %，且血清TIMP-1和TIMP-2含量与肝组织中二者的表达水平有明显相关性，认为TIMP-1和TIMP-2，特别是TIMP-1可作为一种有价值的肝纤维化的诊断指标. 多数研究证实，血清TIMP-1与血清PⅢP、Ⅳ型胶原密切相关. 目前越来越多的研究人员将血清(浆)TIMP-1水平看作肝纤维化诊断指标，但是需要与其他指标联合分析. 郑敏 *et al*[7]初步研究认为测PBMCs内的TIMP-1mRNA、MMP-1/TIMP-1的mRNA比值对慢性肝炎肝纤维化诊断有较大价值，并且二者联合检测可使灵敏度达82.86 %、特异度达100 %，而血清TIMP-1对肝纤维化的早期诊断有一定价值，灵敏度为65 %，特异度为75 %，这与Murawaki *et al*[8]的报道一致，若三者联合检测将使特异度达到100 %. Li *et al*[9]用酶标法检测酒精性肝病患者血清TIMP-1水平，并与组织学对比，发现血清TIMP-1在酒精性脂肪肝时不增高，而在早期酒精性肝纤维化时即有增高，增高水平与肝纤维化程度呈正相关. Koulentaki *et al*[10]ELISA法检测19例处于黄疸期的急性病毒性肝炎患者血清TIMP-1、2，发现血清TIMP-2水平与正常对照组比较明显增加，而血清TIMP-1浓度与正常人比较无明显改变. Boeker *et al*[11]对59例慢性丙型肝炎、19例丙肝肝硬化、30名健康人血清TIMP-1水平的变化研究后发现:正常对照组 < 慢性肝炎无肝纤维化者 < 慢性肝炎伴有肝纤维化者 < 肝硬化者. 对于其他病因引起的肝纤维化，血清TIMP-1是否也同样具有较强的特异性有待于深入研究.

1.3.2 参与调节肝纤维化形成的细胞因子的检测 血清中的TGF-β1(细胞抑制法和酶标法)与正常人有较大的重叠，其诊断价值国内尚无一致观点. 罗瑞红 *et al*[12]认为血清TGF-β1有助于诊断肝硬化和S2期以上的肝纤维化，与血清HA同时检测时，可粗略估计肝纤维化的程度. 李成忠 *et al*[13]报道200例慢性肝炎患者中，仅个别纤维化病例血清TGF-β1水平显著高于正常人，认为血小板数量、肝组织炎症程度、血清和血浆中含量不同等因素影响其临床应用的价值. 郑敏 *et al*[7]用酶标法检测了60例慢性肝炎患者血清TGF-β1含量，认为其对肝纤维化的诊断价值不大. 郑敏 *et al* 已报道用定量PCR法检测PBMC中TGF-β1 mRNA水平，并初步发现其在PBMC中含量与在肝组织中的含量差异无显著性，且认为肝纤维化患者PBMC中TGF-β1和IFN-γ mRNA含量的比值可能有较大的临床意义.

1.3.3 反映慢性肝损伤指标 蔡卫民 *et al* 研究认为血清腺苷脱氨酶(ADA)、谷光甘肽-S-转移酶(GST)等反映慢性肝损伤较ALT为佳. Walsh *et al*[14]认为ALT与肝纤维化相关性较差. Tran *et al*[15]认为凝血酶原指数是判断肝纤维化的最佳指标之一. Oberti *et al*[16]检测了63例慢性肝病患者凝血酶指数、GGT、alpha2巨球蛋白等指标，认为凝血酶指数对诊断肝硬化有重要意义. 李成忠 *et al*[13]认为GGT可作为有无肝纤维化的指标之一，A/G比值可作为判断肝纤维化程度的指标之一. 其他可用于辅助诊断的指标还有γ-球蛋白、IgG、AFP、APOAI等.

1.4 影像学诊断 超声、CT和(或)MRI的合理选用及相互对照验证，有助于动态观察. 使用量化或半量化标准观察肝脏的弹性、肝脏体积、肝脏表面的边缘、肝包膜厚度、肝实质、肝内血管和胆管、脾脏和脾静脉以及胆囊等指标的改变，对肝纤维化的诊断和评估病变的活动度可提供有价值的参考资料. 现有的资料表明，门静脉主干，门静脉每分钟血流量参数、脾厚度、脾静脉宽度及肝右叶最大斜径等参数的改变与肝纤维化程度有较好的相关性.

2 乙型肝炎肝纤维化的治疗

目前将肝纤维化治疗分为去除致病因子(彻底治疗原发病)、抗肝纤维化治疗及对症支持疗法，至今已获公认[17].

2.1 彻底去除原发病因极为重要，抗肝纤维化治疗亦不可忽视 α干扰素和拉咪呋啶抗HBV作用已获承认，虽不理想，但至今尚无更好者. 使用这些药物祛去病毒仍有赖于机体免疫功能，所以在用药同时请勿使用免疫抑制剂为好. 中医中药抗HBV已有较多的报道，但确切疗效尚待证实. 现有人主张拉咪呋啶加中医中药(如乙肝散)治疗亦获益. 业已公认去除病因后，肝纤维化仍可继续发展，因而有必要进行抗肝纤维化治疗.

2.2 抗肝纤维化治疗

2.2.1 适应证 (1)若HBV DNA和HBeAg阳性、ALT>正常2倍、血清胆红素升高<正常2倍，应予抗病毒治疗，剂量、疗程、疗效考核标准详见有关规定. 蔡卫民 *et al* 进行的肝纤维化动物实验研究显示，在炎症明显活动期，胶原合成、分泌增加，但其降解也增加，胶原沉积增加不明显，血清肝纤维化指标也可明显异常，暂不考虑抗肝纤维化治疗. 但也有人主张抗病毒治疗的同时抗肝纤维化治疗; (2)若HBV-DNA和HBeAg阴性，肝活检证实肝纤维化程度>2期(S2)或血清肝纤维化指标>正常上限值($\bar{x} \pm 2s$)，应予抗肝纤维化治疗. 或经降酶，降黄疸等对症治疗后血清肝纤维化指标仍异常者，亦应抗肝纤维化治疗; (3)所谓健康乙型肝炎病毒携带者(血清HBV DNA和HBeAg阳性，但肝功能正常); (4)明显肝硬化者或明显黄疸、腹水者，或伴有其他严重器质性疾病者，目前尚无适宜的抗肝纤维化治疗方法.

2.2.2 抗肝纤维化药物疗效评价 详见有关报道[18].

2.2.3 抗肝纤维化药物 目前国内外学者报道的抗肝纤维化药物多达数十种，但多限于动物实验或因较大的毒性而在临床研究中停止使用. 最近，Dubuisson *et al* [19]报道用去甲肾上腺素拮抗剂(OHDA，6-羟基多巴胺)或特异的α1肾上腺素受体拮抗剂(prazosin)阻断交感神经信号传导，可以抑制肝纤维化的发展. 因肾上腺素受体拮抗剂安全性大，故有望用于临床治疗. 国外尚无一种抗纤维化药物获得药品管理机构批准用于临床，我国已有两种抗肝纤维化药物获得国家药品管理局(SDA)批准. 一种为注射用重组人γ干扰素，1 MU/支，9 mo为一疗程. 前3 mo 1次/d，1支/次，肌注；后6 mo隔日1次，1支/次，肌注. 治疗组总有效率为66 %(显效率为24.2 %)，对照组总有效率为16.2 %(显效率为7.4 %)，两组比较差异显著. 另一种为解放军302医院研制的复方鳖甲软肝片，以鳖甲、赤芍、黄芪、冬虫夏草、板兰根等中药组成. 在临床上报道较多的抗肝纤维化中药复方有北京友谊医院研制的以丹参、黄芪为主的10味中药组成“816”方和上海中医药大学研制的以桃仁、虫草菌丝、丹参及松黄等组成319肝平胶囊(扶正化瘀319方). 上海第二医科大学新华医院等对汉防己甲素(Tet)进行了体外、动物实验与临床研究，均证明有较好的抗肝纤维化作用. 广泛应用的还有西列宾胺、维生素E、硫酸锌，虽无明显副作用，但疗效有限.

3 参考文献

1 蔡卫民, 郑敏, 翁红雷, 刘荣华. 慢性肝炎患者血清纤维化指标的检测及其意义. 中华内科杂志 2001; 40:448-451

2 Murawaki Y, Yamamoto H, Kawasaki H, Shima H. Serum tissue inhibitor of metalloproteinases in patients with chronic liver disease and with hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 1993;218:47-58

3 Murawaki Y, Kawasaki H, Burkhardt H. Serum collagenase activity in chronic liver diseases. *Pathol Res Pract* 1994;190:929-933

4 Murawaki Y, Ikuta Y, Kawasaki H. Clinical usefulness of serum tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 assay in patients with chronic liver disease in comparison with serum TIMP-1. *Clin Chim Acta* 1999;281:109-120

5 Lichtinghagen R, Huegel O, Seifert T, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Bahr M, Boeker KH. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and their inhibitors in peripheral blood cells of patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2000;46:183-192

6 Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Bai XG, Cao YZ. Methodologic research on TIMP-1,TIMP-2 detection as a new diagnostic index for hepatic fibrosis and its significance. *World J Gastroenterol* 2002;8: 282-287

7 郑敏, 蔡卫民, 翁红雷. 肝炎肝纤维化患者血清及外周血单个核细胞内MMP-1、TIMP-1、TGF-β1和PDGF-BB的检测与意义. 临床肝胆病杂志 2002;18:89-90

8 Murawaki Y, Ikuta Y, Okamoto K, Koda M, Kawasaki H. Diagnostic value of serum markers of connective tissue turnover for predicting histological staging and grading in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2001;36:399-406

9 Li J, Rosman AS, Leo MA, Nagai Y, Lieber CS. Tissue inhibitor of metalloproteinase is increased in the serum of precirrhotic and cirrhotic alcoholic patients and can serve as a marker of fibrosis. *Hepatology* 1994;19:1418-1423

10 Koulentaki M, Valatas V, Xidakis K, Kouroumalis A, Petinaki E, Castanas E, Kouroumalis E. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in acute viral hepatitis. *J Viral Hepat* 2002;9:189-193

11 Boeker KH, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Manns MP, Lichtinghagen R. Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta* 2002;316:71-81

12 罗瑞红,杨绍基,谢俊强,赵志新,何有成,姚集鲁. 肝纤维化五项标志物的诊断意义. 中华肝脏病杂志 2001; 9: 148-150

13 李成忠,万谟彬,曾民德,茅益民,范竹萍,曹爱平,李继强,邱德凯,苏炳华,何清波,陆伦根,叶军,蔡雄,陈成伟,王吉耀,胡德昌,张清波,巫善明,周霞秋,朱金水,张惠泉. 非创伤性诊断指标优势组合对肝纤维化诊断价值的初步研究. 中华肝脏病杂志 2001;9:261-263

14 Walsh KM, Timms P, Campbell S, MacSween RN, Morris AJ. Plasma levels of matrix metallo proteinase-2(MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases–1and -2(TIMP-1 and TIMP-2)as noninvasive markers of liver disease in chronic hepatitis C: comparison using ROC analysis. *Dig Dis Sci* 1994;44:624-630

15 Tran A, Hastier P, Barjoan EM, Demuth N, Pradier C, Saint-Paul MC, Guzman-Granier E, Chevallier P, Tran C, Longo F, Schneider S, Piche T, Hebuterne X, Benzaken S, Rampal P. Non invasive predi ction of severe fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *Gastroenterol Clin Biol* 2000;24:626-630

16 Oberti F, Valsesia E, Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Aube C, Gallois Y, Rifflet H, Maiga MY, Penneau-Fontbonne D, Cales P. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis . *Gastroenterology* 1997;113:1609-1616

17 叶维法. 肝病治疗学,第1版. 天津: 天津科学技术出版社, 1990: 341–345

18 蔡卫民. 肝纤维化的治疗. 现代医药卫生 2002;18:259-260

19 Dubuisson L, Desmouliere A, Decourt B, Evade L, Bedin C, Boussarie L, Barrier L, Vidaud M, Rosenbaum J. Inhibition of rat liver fibrogenesis through noradrenergic antagonism. *Hepatology* 2002;35:327-331

乙型肝炎病毒慢性感染和肝癌发生

苏 勤

苏勤,中国人民解放军第四军医大学唐都医院病理科 陕西省西安市 710038

国家自然科学基金项目, No.3880376，39470778，30171052

项目负责人:苏勤,710038 陕西省西安市,中国人民解放军第四军医大学唐都医院病理科. qinsu@fmmu.edu.cn

电话:029-3377467 传真:029-3552079

收稿日期:2002-10-10 接受日期:2003-01-10

苏勤. 乙型肝炎病毒慢性感染和肝癌发生. 世界华人消化杂志 2003;11(6):791-795

http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/791.asp

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma，HCC)是人类最常见的恶性肿瘤之一. 在世界范围内居男性最常见恶性肿瘤的第7位，居女性第9位；在中国被列为男性恶性肿瘤的第3位，仅次于胃癌和食管癌. 全世界每年大约43.7万人被诊断为HCC，其中约一半发生在中国. 多数HCC在发现时已进入进展期，恶性程度高，其5 a存活率小于3 %[1]. 近年来的流行病学和实验室研究初步表明，HCC的主要发病因素有乙型肝炎病毒(hepatitis B virus，HBV)或丙型肝炎病毒(hepatitis C virus，HCV)慢性感染、黄曲霉素B1(aflatoxin B_1，AFB_1)的摄入以及酗酒. 在我国，HBV慢性感染是一种最常见的致病因素，在启东和广西的某些地区还有AFB_1摄入这一因素同时存在.

1 HBV与HCC的关联:流行病学证据

HCC在不同国家或地区发生率差别很大，男性HCC年

发生率在莫桑比克高达112.9/10万，而在欧洲多数国家仅为3/10万，这种地理位置上的差异与世界范围内的HBV感染率基本一致. 来自大多数地区的数据证实HCC发病率与乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen，HBsAg)携带率呈正相关. 另一方面，HCC患者中HBsAg携带率与所处的地区密切相关，HCC高危地区，塞内加尔为61.2 %，南非为61.6 %，香港为82.0 %，中国大陆为86.0 %，菲律宾为70.0 %;中危地区希腊为45.9 %;低危地区美国为14.7-17.9 %[2,3].

在中国，至少80 %的HCC发生于HBsAg携带者，而HBsAg携带者中HCC发生率显著高于不带HBsAg的人群. 在一项对22 707位中国台湾居民的长达6 a的前瞻性调查中，Beasley *et al* 发现HBsAg阳性人群中HCC年发生率为528/10万，而HBsAg阴性个体仅为2.5/10万，相对危险性为217，并发现携带HBsAg与其他癌症和肝内转移癌之间没有联系，证明了HCC与HBV持续感染之间关联的特异性[4].

HBV感染发生在HCC发生之前，围产期感染并转为慢性过程是HCC发生的危险因素之一[5]. 在诸如南部非洲、中国台湾和新加坡等HBV感染发生率较高的地区，HCC常发生于较年轻的个体(50岁以下)，甚至在儿童；而在欧洲和美洲，HCC多发生于50岁以上的个体.

对于这些看起来十分可靠的数据应该指出两点. 第一，上述所谓HBV慢性携带者仅指HBsAg携带者，尚不包括HBV隐匿型感染[6]. 最近的一项研究显示，在某些所谓“HCV相关”的HCC组织[7]和血清标本[8,9]中也存在HBV序列，提示至少在部分“HCV相关”的HCC病例中，HBV隐匿型感染也是一种可能的致癌因素[6,9]. 第二，上述流行病学研究数据只是表明HBV慢性感染与人HCC有关，要证实HBV参与人HCC发生还需许多直接证据，主要包括实验研究和针对HBV的干预疗法对HCC发生的影响的研究.

2 HBV和HCC的关联: 实验室证据

几个方面的实验室研究已经确立了HBV和HCC之间有着明显且特异的联系，但这种联系仅限于HBV持续性感染.

2.1 动物模型的研究 HBV是一种嗜肝DNA病毒，呈环状的DNA部分为双股，基因组长度仅为3 200 bp左右，但却有6个部分重叠的开放阅读框架. 三种动物嗜肝病毒与HBV在形态和基因组结构上极为相似，即土拨鼠肝炎病毒(woodchuck hepatitis virus，WHV)，地松鼠肝炎病毒(ground squirrel hepatitis virus，GSHV)和中国家鸭乙型肝炎病毒(duck hepatitis B virus，DHBV)，他们都是部分双股DNA病毒，有与HBV相似的S抗原、C抗原和DNA聚合酶(P)等编码区. HBV、WHV和GSHV还有第四个基因编码框，X基因，编码x蛋白. HBV与WHV、GSHV和DHBV之间同源核苷酸比例分别为70 %、50 %和40 %，都能引起肝脏慢性持续感染，形态学上类似于慢性肝炎. 近20 a来人们对于WHV与HCC的研究为HBV的致癌作用提供了一系列间接的，但却强有力证据. 从幼龄时感染WHV的土拨鼠几乎100 %在3 a之内发生HCC，而未感染的土拨鼠HCC自然发生率极低；虽然DHBV持续感染也能引起病毒DNA整合入肝细胞并能造成基因重排，但其致癌能力至今还未确立[10].

2.2 HBV DNA转基因动物研究 HBV感染具有明显的种属特异性，如何建立与人自然感染情况相似，但又经济方便的HBV感染动物模型一直困扰着科学家们. 向小鼠受精卵或早期胚胎中注射HBV DNA或其片段，由此在子代小鼠中部分成为HBV转基因小鼠. 目前已成功地进行了HBV S基因及X基因的转基因研究，结果是有启示意义的.

Kim *et al* [11]在1991年首先报道，涉及到HBV x蛋白(HBV x protein，HBx)编码区的转基因可诱发小鼠癌前变异肝细胞病灶(foci of altered hepatocytes，FAH)和HCC，表明了HBx在肝脏的致癌性. 在其后的研究中，Koike *et al* [12,13]表明，HBx致癌性的强弱与其表达水平有关.

另一个HBV转基因动物模型是Chisari *et al* [14]制备的. 他们把含PreS1/S2的HBV DNA片段与小鼠白蛋白启动子一起构建成重组体，这种转基因小鼠肝细胞中大量表达HBsAg(p25，gp27)及PreS1/S2多肽(p43，gp45)，导致大部分肝细胞中这些蛋白异常储积于滑面内质网内，形成毛玻璃样细胞. 在这些小鼠肝脏中，出生后6 mo开始出现FAH，9 mo出现肝细胞腺瘤，存活12-34 mo的31只动物中，有8只出现HCC (25.8 %)[15]. 然而，这一模型中有2个事实值得注意. 首先在肝实质的肿瘤前期病灶FAH及肿瘤细胞中，HBsAg表达明显减弱或已停止，这种HBsAg表达与HCC发生和进展的关系在HBV持续感染的人肝脏中也存在[16];其次，Chisari模型中所用的重组体含有HBx编码序列，尚不知道这一模型中有无HBx表达，因而不能完全除外HBx的致癌作用.

2.3 HBV DNA的体外细胞转染实验 Schaefer *et al* [17]用HBV DNA转染经SV40大T抗原(SV40-TAg)基因永生化的小鼠肝细胞系FMH202和转化生长因子α(transforming growth factor α，TGFα)永生化的小鼠肝细胞系AML12，得到了稳定表达HBV颗粒的克隆，这些克隆都获得转化能力. 此外，用HBV DNA转染永生化细胞系NIH3T3和HepG2细胞系也使其转化. 应用HBV DNA中部分片段进行细胞转染观察显示，x蛋白编码基因最有可能是一种肿瘤基因，在高水平表达的情况下能在短期内引起细胞转化. 然而，这些体外实验结果能够在多大程度上反映体内情况？在自然感染的人或动物肝脏中，x蛋白表达水平远低于上述转染细胞或转基因动物肝组织. 实际上，直到最近才在WHV感染的土拨鼠肝脏内经免疫沉淀浓缩和高度敏感的化学发光检测技术证明x蛋白的存在[18]. 在HBV感染的人肝组织中HBx含量可能更低，其检测始终是一个相当困难而又充满争议的问题.

2.4 HBx的功能及其与人HCC发生的关系

2.4.1 HBx的功能 HBx是一种154 aa小肽，其功能仍

未完全搞清. 在WHV，x蛋白为病毒复制所必需，但对HBV的复制没有如此重要. 已报道HBx有许多功能，其中与宿主细胞的生长调节有关的功能可能与HCC发生有关. (1) 反式激活其他基因:主要是应用几个细胞系(包括HepG2、HuH7和NIH3T3)发现的. 其靶基因既有病毒序列，也有细胞序列. 前者包括HBV基因组中C基因P/EnhI/II、 S1基因P/EnhI/II、S2基因P/EnhI/II和X基因P/EnhI、HIV-1的LTR、HSV的TK、MMTV的LTR、RSV的LTR、SV40的P/Ehn和CMV的P/Ehn；后者包括M-肌动蛋白、白蛋白和α-球蛋白等编码基因，HLA-DR/MHC、全属硫蛋白及β-干扰素、丙氨酸tRNA ($tRNA^{Ala}$)，原癌基因c-*myc*、c-*jun*、c-*fos*、*ras*、*raf*，以及AP-2、NF-kB、增强子结合蛋白(EBP)、TATA结合蛋白(TATA-BP)、TGFb、CDK2和CDC2等细胞调节因子的编码基因[19]. 基于上述体外实验结果，目前认为HBx可能通过反式激活某种类型细胞中的生长调节基因而参与人HCC发生. 已发现人肝脏中胰岛素样生长因子II (insulin-like growth factor II， IGF II)基因在某些散在的(肝小多角细胞)或灶性分布的(小细胞性不典型增生)小肝细胞内先后活化，而IGF II表达与HBx表达有关，提示HBx可能通过活化某些肝细胞中的IGF II基因，引起这种细胞的增生形成肝实质的小细胞性不典型增生，参与HCC发生[20]. 最近的观察已表明肝小多角细胞不仅参与肝脏实质修复，而且见于较晚期的混合细胞性FAH中[21]，可能与这些癌前病灶中小细胞性不典型增生有关. (2) 结合p53蛋白的能力: p53蛋白由*P53*肿瘤抑制基因编码，具有调节细胞周期和细胞凋亡，以及DNA修复等功能，与肿瘤细胞的恶性生长紧密关联. *P53*基因突变可导致p53蛋白失去上述功能，导致细胞恶变. Feitelson *et al* [22]报道HBx可与野生型p53结合，导致后者灭活，这被认为是HCC的另一发病机制. (3) 干扰细胞DNA修复:近年来的研究显示，HBx可与细胞内的一种DNA修复相关蛋白结合，这种结合导致宿主细胞对紫外线损伤的抵抗力降低，这提示HBx也可通过干扰细胞DNA修复过程而参与HCC发生. 此外，还有报道称HBx和p53的结合也可阻断这种DNA相关蛋白的功能. 但实际上，这种蛋白间的结合在HBV感染的人肝组织中并不常见[23-25].

2.4.2 HBV感染的人肝组织及HCC中HBx的表达 尽管已在WHV感染的土拨鼠肝组织中成功地检测到x蛋白，但在人肝组织中检测HBx却非常困难[23,24]. 这可能由于其表达量远低于WHV x蛋白或其半衰期短.

应用重组的HBx或人工合成的HBx片段，已经制备了至少22个多克隆或单克隆抗体，其中多数被认为是特异的，适用于HBx的免疫组化、免疫沉淀、免疫印迹或酶联免疫测定. 然而，不同实验室应用各自生产的抗体进行的免疫组化和免疫沉淀结果非常不一致，难以评价. 为了澄清这一问题，Su *et al*[24]从5个实验室收集了上述抗体中的11个，对其进行了鉴定. 结果表明，几乎所有抗体都识别黏附于纤维素膜上的HBx，但与组织内的HBx结合的特异性或亲和力多数不完全合格. 应用多种抗体进行免疫组化和免疫沉淀反应，他们在HBV相关的肝硬变及HCC组织中显示出了HBx，表明其只存在于HBV慢性感染的肝脏中，仅见于胞质中. 阳性细胞包括FAH内或外的肝细胞、肝小多角细胞以及HCC细胞. 阳性细胞数在肝硬变组织中少，在有的FAH和HCC组织中较多，这不同于HBsAg和HBcAg的表达. 后二者虽然在慢性乙型肝炎及肝硬变组织中常广泛表达，但在FAH及其形成的结节中表达明显减弱，HCC组织中表达基本停止. 由于癌周肝硬变实质大部分被变异肝细胞病灶或结节占据，其HBsAg和HBcAg表达水平远低于不荷HCC的肝硬变. 这些数据表明，在HCC发生(肝实质细胞→变异肝细胞病灶FAH →变异肝细胞结节→ HCC)的过程中，HBx表达得到选择性地保持，提示他参与人HCC发生. 他们的结果还表明，无论是在HCC中，还是在肝实质中，HBx和p53表达的组织学及亚细胞分布都不同，在其匀浆中也未发现他们的免疫共沉淀证据. 这表明二者在人肝组织及HCC中独立存在[25].

2.4.3 HBx与人HCC发生 有充足的体外及动物实验证据表明HBx是一种致癌基因，但要在人体肝脏证实这一点还需大量证据. Feitelson *et al* [19,22]提出HBx通过结合p53而灭活其功能是HBV诱发HCC发生的一个重要机制，但HBV感染肝脏中HBx和p53独立存在这一事实不支持上述假说[25]. 基于HBx表达在HCC组织及某些癌前病灶中的选择性保留，HBx对多种细胞生长调节因子的反式激活作用，以及HBV感染人肝脏中IGF II和HBx表达的密切关系，有理由认为HBx可通过反式激活某些生长调节基因而参与人HCC发生[10,20,24].

3 HBV和HCC的关联:临床干预研究

尽管已报道多种制剂可抑制慢性乙型肝炎患者体内HBV的复制，其中包括针对病毒DNA的反义核酸，但目前尚无法安全清除肝细胞内的整合型病毒序列. 只有提高人群的卫生及健康水平，实行大规模的疫苗接种才能从根本上控制HBV的传播. 目前已有70多个国家进行儿童普遍预防接种. 在出生后3 mo内进行预防接种已经使HBV传播发生率及病毒携带者的出现率显著降低. 如果上述免疫保护作用能够导致相应人群中HCC发生率显著降低，将是HBV感染与人HCC发生之间因果关系的直接证据.

HCC多发于40-60岁的成年人，因此要全面观察HBV免疫接种后HCC发生率的降低至少需40 a. 已有证据表明，这种接种免疫已经导致接种人群中HCC发生率显著减低. 在中国台湾，HCC是一种较常见的儿童恶性肿瘤，100 %发生于HBV携带者. 1997年的一项统计报告显示，在6-14岁年龄组，HCC年发生率已由1981-1986年的0.7/10万降至1986-1990年的0.57/10万，1990-1994年

又降至0.36/10万；HCC年发生率在1974-1984年间出生的儿童中为0.52/10万，在1984-1986年间出生的儿童中降到0.13/10万[26]. 来自韩国的最新统计资料表明，即使在成人，通过注射HBV疫苗进行人工免疫也能显著降低HCC发生的危险性[27].

上述数据表明，人HCC发生确与HBV持续感染有关. 同时也显示，通过全球性地HBV疫苗接种，人类会在很大程度上预防HBV相关HCC的发生.

4 HBV感染诱发HCC的可能模式以及肝实质内的“癌前病变”

HBV相关的HCC发生机制仍未完全搞清. 较有影响的模式有以下三个: (1) HBV DNA嵌入激活某些原癌基因; (2) HBx的反式激活其他肿瘤相关基因; (3) HCC发生的多阶段模式(多步多击理论)和抵抗细胞(R细胞)理论[10].

肿瘤的发生是一个逐渐演进的过程，人体某些部位发生的增生性病变容易演变为癌，称为癌前病变. 已提出的人肝脏内“癌前病变”主要包括以下五种.

4.1 肝实质的大细胞性改变(large-cell change，LCC) 又称肝细胞异型增生(liver cell dysplasia). 1973年由Anthony *et al*[28]描述，是指肝细胞体积增大，伴核增大、核多形及多个核出现，多年来一直被某些作者认为是“癌前病变”. 然而，近年来的研究表明肝实质细胞的这种改变不是癌前病变，而是对某些致病因子的反应，可能反映了肝细胞的有丝分裂障碍[21,29].

4.2 肝实质的小细胞性改变(small-cell change，SCC) 又称小细胞性异型增生(small-cell dysplasia)，是1983年Watanabe *et al*[30]在HBV相关的肝硬变中观察到的一种改变. 作者认为，某些类型的SCC，尤其是小细胞性病灶或结节，可能是一种真性不典型增生，是肝脏的癌前病变.

4.3 腺瘤样增生(adenomatoid hyperplasia，AH) 这种结节性病变首先被日本学者Arakawa *et al*描述，是指硬变肝脏中体积明显大于其周围结节的结节状病变. 多数AH直径0.8-2.0 cm，常有几个汇管区，可通过高清晰度的超声波检查发现并被手术切除. 依其是否伴有SCC把这种病变分为普通型AH和不典型AH. 已经知道前者不过是体积较大的再生结节，与HCC的关系不如后者密切. 但对后者的的性质仍所知甚少，这一点可以由其拥有许多摸棱两可的描述性名称反映出来[10]. 因此，国际工作组建议使用“伴肝细胞异型增生的结节”(dysplastic nodule)代表后者，以取代其他描述性名称[31]. 近年来的研究表明，部分不典型AH属肝细胞单克隆性增生[32,33].

4.4 变异肝细胞病灶(FAH)和结节(nodules of altered hepatocytes) FAH是指由细胞学和细胞化学表型明显变异的成熟肝细胞组成的局部病灶. 这种病灶最先在给予亚硝胺类致癌剂的大鼠肝脏内被发现，后来相继在包括大鼠、小鼠、土拨鼠、火鸡、鱼类以及转基因小鼠几种动物模型中被显示，在化学致癌物、放射线及致癌病毒诱发的肝癌发生早期出现. 大量的证据表明，FAH是肝细胞肿瘤的前体，可演变为肝细胞腺瘤和HCC[34]. 实际上，FAH在10 a前已被用作评价药品致癌性的一个指标[35]. 最近的研究表明，在Bannasch模型上得到的大部分知识都能用于解释人HCC的发生，FAH也见于人肝硬变及其他慢性肝脏病变中，属于HCC前期病变; 伴有SCC的FAH应被看作肝实质的癌前(恶性前期)病变[21].

4.5 肝硬变 由于约80 %的HCC发生于硬变肝脏内，100 a来肝硬变都被认为是HCC的前期病变. 然而，不同类型的肝硬变之间发生HCC的可能性有很大差别，FAH发生率及其平均直径也不相同; 另一方面，并不是所有的HCC都发生在肝硬变出现之后. 因此，认为肝硬变本身是一种癌前病变的观点在概念和医疗实践上都是不全面的，肝硬变与HCC之间不是因果关系. 在病理发生过程中二者可能有某种联系，但他们是两个不同的，可分开的病理过程. 这正象Theise评论的那样，如果说二者有联系，那也更象堂兄弟，而不是父子关系[36].

致谢:此文的完成曾得益于与刘彦仿、Peter Bannasch、Claus H Schroeder、聂青和教授的讨论，作者深表感谢.

5 参考文献

1 Parkin DM. The global burden of cancer. *Semin Cancer Biol* 1998;8:219-235

2 Austin H, Delzell E, Grufferman S, Levine R, Morrison AS, Stolley PD, Cole P. A case-control study of hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus, cigrette smoking, and alcohol consumption. *Cancer Res* 1986;46:962-966

3 Yeh FS, Mo CC, Luo S, Henderson BE, Tong MJ, Yu MC. A serological case-control study of primary hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *Cancer Res* 1985;45:872-873

4 Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 1981;2:1129-1133

5 Beasley RP. Hepatitis B virus, the major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1988;61:1942-1956

6 苏勤. 乙型肝炎病毒隐匿型感染. 肝脏 2002;7:197-198

7 Koike K, Shimotouno K, Okada S, Okamoto H, Hayashi N, Ueda K, Kaneko S, Koike K, Yokosuka O, Chiba T, Marusawa H, Hino O, Utida T, Omata M, Juji T, Nojiri N, Takada K, Miyamura T, Osuga T, Ito Y. Survey of hepatitis B virus co-infection in hepatitis C virus-infected patients suffering from chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma in Japan. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:1270-1272

8 Su Q, Wang SF, Chang TE, Breitkreutz R, Hennig H, Takegoshi K, Edler L, Schröder CH. Circulating hepatitis B virus nucleic acids in chronic infection: representation of differently polyadenylated viral transcripts during progression to nonreplicative stages. *Clin Cancer Res* 2001;7:2005-2015

9 苏勤,张伟,刘节,王淑芳,Takegoshi K,Schröder CH. 乙型肝炎病毒慢性感染者血清中不同类型病毒转录体的检测及其意义. 世界华人消化杂志 2003; 11:134-143

10 刘泽富,聂青和. 病毒性肝炎的诊断和治疗. 第1版. 北京:人民军医出版社, 2001:221-262

11 Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature (London)* 1991;351:317-320

12 Koike K. Hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis. *Intervirology* 1995;38:134-142

13 Koike K, Moriya K, Iino S, Yotsuyanagi H, Endo Y, Miyamura T, Kurokawa K. High-level expression of hepatitis B virus HBx

gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology* 1994;19:810-819
14 Chisari FV, Filippi P, Buras J, Mclachlan A, Popper H, Pinkert CA, Palmiter RD, Brinster RL. Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:6909-6913
15 Toshkov I, Chisari FV, Bannasch P. Hepatic preneoplasia in hepatitis B virus transgenic mice. *Hepatology* 1994;20:1162-1172
16 Su Q, Zerban H, Otto G, Bannasch P. Cytokeratin expression is reduced in glycogenotic clear hepatocytes but increased in ground-glass cells in chronic human and woodchuck hepadnaviral infection. *Hepatology* 1998;28:347-359
17 Schaefer S, Gerlich WH. In vitro transformation by hepatitis B virus DNA. *Intervirology* 1995;38:143-154
18 Dandri M, Chirmacher P, Rogler CE. Woodchuck hepatitis X protein is present in chronically infected woodchuck liver and woodchuck hepatocellular carcinomas, which are permissive for viral replication. *J Virol* 1996;70:5246-5254
19 Feitelson MA, Duan LX. Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 1997;150:1141-1157
20 Su Q, Liu YF, Zhang JF, Zhang SX, Li DF, Yang JJ. Expression of insulin-like growth factor II in hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma: its relationship with hepatitis B virus antigen expression. *Hepatology* 1994;20:788-799
21 Su Q, Benner A, Hofmann WJ, Otto G, Pichlmayr R, Bannasch P. Human hepatic preneoplasia: phenotypes and proliferation kinetics of foci and nodules of altered hepatocytes and their relationship to liver cell dysplasia. *Virchows Archiv* 1997;431:391-406
22 Feitelson MA, Zhu M, Duan LX, London WT. Hepatitis Bx antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1993;8:1109-1117
23 Henkler F, Waseem N, Golding MH, Alison MR, Koshy R. Mutant p53 but not hepatitis B virus X protein is present in hepatitis B virus-related human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1995;55:6084-6091
24 Su Q, Schröder CH, Hofmann WJ, Otto G, Pichlmayr R, Bannasch P. Expression of hepatitis B virus X protein HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1998;27:1109-1120
25 Su Q, Schröder CH, Otto G, Bannasch P. Overexpression of p53 protein is not directly related to hepatitis B x protein expression and is associated with neoplastic progression in hepatocellular carcinomas rather than hepatic preneoplasia. *Mutation Res* 2000;462:365-380
26 Chang MH, Chen CJ, Lai MC, Hsu HM, Wu TC, Kong MS, Liang DC, Shau WY, Chen DS. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in Children. *N Eng J Med* 1997;336:1855-1859
27 Lee MS, Kim DH, Kim H, Lee HS, Kim CY, Park TS, Yoo KY, Park BJ, Ahn YO. Hepatitis B vaccination and reduced risk of primary liver cancer among male adults: a cohort study in Korea. *Int J Epidemiol* 1998;27:316-319
28 Anthony PP, Vogel CL, Barker LF. Liver cell dysplasia: a premalignant condition. *J Clin Pathol* 1973;26:217-223
29 Santoni-Rugiu E, Nagy P, Jensen MR, Factor VM, Thorgeirsson SS. Evolution of neoplastic development in the liver of transgenic mice co-expressing *c-myc* and transforming growth factor-alpha. *Am J Pathol* 1996;149:407-426
30 Watanabe S, Okita K, Harada T, Kodama T, Numa Y, Takemoto T, Takahashi T. Morphologic studies of the liver cell dysplasia. *Cancer* 1983;51:2197-2205
31 International Working Party. Terminology of nodular hepatocellular lesions. *Hepatology* 1995;22:983-993
32 Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, Terada M, Hasegawa H. Clonal origin of atypical adenomatous hyperplasia of the liver and clonal identity with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1988;95:1664-1666
33 Piao Z, Park YN, Kim H, Park C. Clonality of large regenerative nodules in liver cirrhosis. *Liver* 1997;17:251-256
34 Bannasch P. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma: sequential cellular, molecular, and metabolic changes. *Prog Liver Dis* 1996;14:161-197
35 Bannasch P. Preneoplastic lesions as end points in carcinogenicity testing. I. Hepatic preneoplasia. *Carcinogenesis* 1986;7:689-695
36 Theise ND. Cirrhosis and hepatocellular neoplasia: more like cousins than like parent and child. *Gastroenterology* 1996;111:526-528

治疗性疫苗 - 慢性乙型肝炎患者的希望

王全楚,聂青和

王全楚,聂青和,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038
项目负责人:王全楚,710038,陕西省西安市新寺路1号,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. quanchuwang998@hotmail.com
电话:029-3377595 传真:029-3537377
收稿日期:2002-12-10 接受日期:2002-12-20

王全楚,聂青和. 治疗性疫苗 - 慢性乙型肝炎患者的希望. 世界华人消化杂志 2003;11(6):795-798

http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/795.asp

0 引言

疫苗的概念是在200 a前Jenner发现事先接种牛痘能够阻止天花的发生之后首先提出的. 近100 a来，疫苗的开发和应用已成为医学科学的重大成就之一，且已广泛用于传染病的预防和治疗. 这些疫苗成功的原因在于他能够有效地诱导机体产生保护性抗体. 然而，对某些细胞内病原菌如结核杆菌、利什曼原虫以及寄生虫等这些抗体几乎不起作用，因为对这些病原体的防御更多地依赖于细胞免疫，而不是抗体介导的体液免疫. 对如乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)、疟原虫等感染，则可能需要细胞免疫和体液免疫的双重介导.

1995年前医学界普遍认为，疫苗只作预防疾病用. 随着免疫学研究的发展，人们发现了疫苗的新用途，即可以治疗一些难治性疾病. 从此，疫苗兼有了预防与治疗双重作用，治疗性疫苗属于特异性主动免疫疗法. 现在准获使用的疫苗来自杀死或灭活的完整细胞、重组蛋白或减毒的活病原体，都能刺激机体产生抗体. 然而除了减毒活疫苗如水痘 - 带状疱疹病毒疫苗外，其他疫苗并不能特异的诱导细胞免疫，此外，如果用减毒活疫苗来预防诸如HIV之类的病毒感染，可能给疫苗制备和接种疫苗的人群带来危险. 因此，积极寻找既能同时诱导体液和细胞免疫应答又具安全性的疫苗，实乃当务

之急. 最近出现的新型疫苗如核酸疫苗、T细胞疫苗、树突状细胞疫苗等彻底改变了疫苗多为蛋白、只能预防的经典概念，引进了治疗性疫苗和核酸及细胞疫苗的新内容，大大拓展了人们对疫苗组成和功能的认识，被称为是疫苗学的第三次革命. 因他们不但具有传统疫苗的一般功能，且能激发机体特异性细胞和体液免疫应答，用于临床现症患者的治疗. 故称之为新概念疫苗.

新概念疫苗与传统疫苗的区别表现在:(1)成分不同:传统疫苗多为死疫苗/减毒活疫苗或重组亚单位疫苗；新型疫苗则为编码无毒力抗原蛋白的病毒核酸或能激发特异性机体免疫应答的细胞疫苗；(2)机制不同:传统疫苗主要靠病毒的抗原蛋白刺激机体产生中和性保护抗体；新型疫苗不仅能刺激机体产生保护性抗体，而且能激发特异性细胞免疫应答; (3)作用不同:传统疫苗只能起到一定的预防作用，新型疫苗不仅能预防疾病，而且更能起到特异的治疗作用，治疗性疫苗具有更广泛的应用前景.现就治疗性疫苗的新概念以及目前在慢性乙型肝炎中的研究现状作一简要的概述.

1 核酸疫苗

所谓核酸疫苗(nucleic acid vaccine)，是将含编码外源蛋白基因的质粒DNA，直接导入动物组织，外源基因于体细胞中表达后，表达产物被提呈，与主要组织相容性复合物(MHC)结合，刺激机体产生相应的抗体和细胞毒性T淋巴细胞(CTLs)，分别介导体液免疫和细胞免疫应答. 这种外源基因是抗原的来源，具有疫苗的功能，又称为DNA疫苗，由于不需任何化学载体，故又称裸DNA疫苗[1,2].

1990年Wolff *et al*在做小鼠基因治疗试验时偶然发现，将编码基因的质粒DNA直接注射入动物肌肉细胞内，能在动物体内表达抗原并诱导机体产生免疫应答.这一发现打开了通往新的免疫途径的大门. 由于不加任何佐剂或载体，故又称裸DNA免疫.1994年在日内瓦召开的专题会议上将这种疫苗定名为核酸疫苗. 核酸疫苗的出现或许将是疫苗发展史上的一次革命. 现已做了大量的DNA疫苗的动物试验. 主要包括流行性感冒病毒、乙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒、狂犬病毒、淋巴细胞性脉络丛脑炎病毒、疟原虫和支原体及肿瘤的预防和治疗研究等[3-9].

迄今，国外已有至少4种DNA疫苗被批准进入Ⅰ期临床试验. 1996年美国FDA批准对健康志愿者进行艾滋病DNA疫苗人体实验. 1998年MacGregor *et al*首次报道了DNA疫苗治疗艾滋病病毒HIV-1感染者的人体实验结果. 据最新消息，英国已经批准在今年8月开始进行一种专门针对非洲人的HIV DNA疫苗的I期临床试验. 1998年，美国海军宣布他们已经成功地在健康人体上检测了针对疟疾的DNA疫苗，他们认为这种疫苗最早得到广泛应用将可能在2005年. 目前，DNA免疫接种的领域正在迅速发展，已经发展的现行疫苗不仅使用DNA，而且还包括附加物，他有助于DNA进入靶细胞，或者起到佐剂的作用，刺激或诱导免疫应答[10-13].

1.2 乙肝病毒核酸疫苗

乙型肝炎核酸疫苗就是将乙型肝炎病毒(hepatitis B virus，HBV)一种或几种抗原的编码基因直接注入宿主体内，该基因能在宿主细胞内转录和表达，并继而诱生特异的体液和细胞免疫应答. 这类疫苗不含蛋白质或多肽，仅含核酸，在体内表达后具有疫苗功能，被称作乙型肝炎核酸疫苗，包括DNA疫苗和RNA疫苗，主要是指DNA疫苗. 近年来兴起的核酸疫苗的研究已在乙肝的防治中显示出诱人的应用前景，引起了国内外学者们的关注. 与传统的血源疫苗和基因工程相比，乙肝DNA疫苗有很多优点，如:比乙肝血源疫苗相对安全;比基因工程多肽疫苗的制备简单、快捷; 性质更稳定，便于保存和运输; 乙肝DNA疫苗还可通过对目的基因的构建，选择所需的抗原决定簇，可以对同种异株的病毒产生免疫应答，发挥交叉保护作用. 更为重要的是，乙肝DNA疫苗可在机体的真核细胞中表达糖基化抗原蛋白，并可按照病毒抗原的天然构象进行折叠，模拟了病毒的自然感染过程，不仅可以诱导针对HBsAg的保护性抗-HBs产生，而且可以同时诱发特异的细胞免疫，所以兼有预防和治疗作用，不久的将来乙肝病毒核酸疫苗将应用于临床[14,15].

2 T细胞疫苗

T细胞疫苗原是指将T细胞或体外T细胞表位多肽刺激产生的T细胞作为疫苗接种，用于治疗某些自身免疫疾病.但将依据MHC-I类分子特异的多肽结合基序(MHC binding motif)合成的多肽，在体外诱导产生的抗原特异性细胞毒T淋巴细胞(CTL)，用于治疗病毒性疾病，则是近几年的新思维，新设想[16]，将T细胞从过去应用为靶细胞转变成效应细胞，为T细胞疫苗的概念增添了新的内涵.

2.1 T细胞疫苗与CTL反应

自从Doherty和Zinkernagel发现CTL能够杀伤外源微生物感染细胞，而且这种杀伤作用依赖于CTL对外源多肽和自身分子(MHC)的双重识别之后，越来越多的研究表明:病毒特异性的CTL介导的细胞免疫具有清除病毒的功能，是宿主防御病毒感染的主要机制之一. 正因为此，CTL表位及CTL介导的细胞免疫应答的研究受到越来越多的关注. 传统的病毒疫苗(减毒或灭活)，含有完整的病毒蛋白质，以刺激机体产生抗体为主，难以有效诱导产生MHC-I类限制性的CTL和清除细胞内病毒颗粒. 目前临床应用的过继免疫治疗如LAK细胞、CD3-AK细胞均为非特异杀伤细胞，靶向性差.因此，有学者已直接用单个或多个CTL多肽导入体内(多肽疫苗)，诱导机体产生特异性CTL应答[17-19]，虽然能够观察到CTL应答，但有时滴度不高，可能是由于较短的CTL多肽更易被血清蛋白酶降解，从较短的(通常为几个-十几个氨基酸)多肽中去除一个或两个氨基酸将改变其结合HLA的能力;若将几个多肽交联，既可能形成新的CTL表位，诱导特异性CTL失败，又可能产

生针对多肽的抗体; 另外，低剂量抗原皮下注射可以产生免疫应答，而高剂量静脉注射则可能引起免疫耐受.

2.2 治疗病毒性肝炎 T细胞疫苗是用多肽在体外诱导产生特异性CTL，后者被克隆、扩增、筛选和鉴定后，仅将MHC-I类限制的CD8+ T细胞输入机体，诱导细胞免疫应答产生，从而解决了多肽疫苗存在的上述问题，而且直接回输CTL，可以人为地控制CTL的强度，避免其过度，导致大量受染肝细胞死亡，也可避免其过低，无清除病毒作用.

治疗性疫苗被认为是抗病毒治疗的一个重要方向，已有研究者进行了探索. 其中DNA疫苗和HLA限制的识别HBc表位的细胞毒T淋巴细胞疫苗能够活化细胞和体液免疫应答. 在转基因鼠中，这种治疗性疫苗能够打破免疫耐受，但人体研究尚待开展. 因此，我们在国家自然基金的资助下，利用转染了HBV基因(S+S1)或(S+S1+S2)的小鼠骨髓瘤SP2/0细胞皮下注射，形成的皮下移植瘤HBV小鼠模型和HBV基因转染细胞系，发现MHC-I限制的CTL表位多肽体外诱导的特异性CTL，在体内外对HBV感染细胞均具有杀伤作用，可能成为病毒性疾病或肿瘤免疫较好的疫苗后选之一[20,21].

3 树突状细胞疫苗

树突状细胞(dendritic cell，DC)是专职抗原呈递细胞，能有效地将抗原呈递给T淋巴细胞，从而诱导CTL活化. 荷载抗原的DC具有疫苗的功能，故称树突状细胞疫苗.荷载的抗原既可以是病毒抗原、HLA限制的CTL表位(8-10个氨基酸的短肽)基因，也可以是肿瘤细胞，还可以是编码肿瘤抗原的基因.由于DC细胞疫苗可以不依赖于CTL靶细胞，又有较高的抗原呈递效率，正成为新一代疫苗的代表[22].

3.1 研究意义及现状 核酸疫苗诱导特异性免疫应答产生已被大量的实验室证实，但普遍存在着抗体滴度不高，CTL杀伤率不强等问题. 其原因可能与病原体感染后，抗原呈递细胞(APC)，尤其是树突状细胞数量减少、功能降低有关[23-26]. 如何绕过或提高DC免疫功能低下，诱导出更强有力的、更具广泛性的免疫应答，应当成为基因疫苗和免疫治疗亟待解决的突出问题之一. 业已证实，DC是目前发现的功能最强的抗原呈递细胞，也是唯一能激活初始T细胞的抗原呈递细胞[27]. 因此，应用抗原或抗原多肽体外冲击致敏DC，然后将之回输或免疫接种荷瘤宿主或带病毒特异性抗原的宿主，进行免疫治疗；利用DC与肿瘤细胞融合成为新型带有DC功能及肿瘤特异抗原的融合细胞瘤苗的报道[28];以及利用病毒载体将带有肿瘤或病毒抗原的编码基因转染DC，使之在DC内持续表达相应特异性抗原，诱导产生特异性抗肿瘤或抗病毒免疫反应等方法应运而生.

3.2 DC在HBV发病机制中的作用 近年来，越来越多的证据表明，由DC激活的细胞免疫特别是CTL介导的免疫反应，在HBV发病机制中发挥着十分重要的作用. 一般认为，细胞免疫功能低下是HBV感染慢性化的主要原因.作为主要的抗原呈递细胞，DC的功能缺陷将直接影响T细胞的免疫反应. 已有实验证实DC可诱导肿瘤细胞免疫耐受，但婴幼期免疫耐受是否与此有关尚需进一步研究. Oka *et al*[29]使用HBV转基因鼠(HBVTg)模型研究PBMC来源的DC与免疫接种后应答的关系，发现疫苗接种后应答者DC功能明显强于无应答者. 在另一些实验中有潜在DC功能的HBV？Tg经免疫接种治疗后无HBsAg和HBeAg的表达，HBV DNA滴度也较低. DC功能较差者治疗前毫无反应，两组治疗前HBsAg、HBeAg和HBV DNA浓度无差异. 提示DC活化程度可作为判断免疫治疗预后的指标. 研究发现，DC免疫可以打破HBVTg对CTL的免疫耐受，而且转基因鼠不能产生抗?HBs只与DC功能缺陷有关，与T、B细胞功能无关. 经IFN处理后DC可上调表达MHC和T细胞抗原(KLM). 国内外学者已有报道慢性乙型肝炎患者外周血DC功能明显低下，抗原呈递不足可能是导致HBV感染慢性化的原因之一[30].

近年来，科学家在几种动物模型中进行了乙肝DNA病毒感染的“感染与免疫”机制研究，取得明显进展. 应用四聚体和细胞质内细胞因子染色在慢性乙型肝炎患者进行的细胞免疫应答的研究，阐明了慢性乙型肝炎的基础免疫缺陷. 这些基础实验研究对评价各种疫苗和候选疫苗的治疗作用是极其重要的. 1998年国外开始用乙肝病毒基因转移鼠为动物模型研究乙肝病毒治疗性疫苗的抗病毒作用. 同年在法国、日本也开始用乙肝病毒某些基因片段表达的多肽加上各种不同佐剂配制的治疗性疫苗作临床研究，观察这种多肽疫苗对慢性乙肝病毒携带者的治疗作用. 其结果揭示，这种疫苗对乙肝病毒基因转移鼠有抗病毒作用，单一应用特别是与抗乙肝病毒药联合应用，对慢性乙肝病毒携带者有一定的疗效. 1999年美国研制了新的多肽治疗性疫苗，并对这种治疗性疫苗的免疫学作用进行了深入研究. 美国这一研究具有很大意义，因为这一研究中，作者提出了一些免疫学检测方法，这些检测方法不仅可以预测治疗效果，而且还初步证明，治疗性疫苗可以打破慢性乙肝病毒感染患者最主要的免疫学反应紊乱，即对乙肝病毒及其抗原不产生免疫应答-免疫耐受状态. 我国学者闻玉梅 *et al* 报告，现在有多种治疗性乙肝疫苗正在进行临床前期或临床研究，由复旦大学与北京生研所合作开发的重组治疗性乙肝疫苗(YIC)已通过了国家药品监督管理局认证.

免疫耐受是造成慢性乙肝病毒携带者呈持续病毒感染状态的主要原因之一，也是治疗上最难解决的问题. 现有治疗慢性乙肝的抗病毒药对慢性乙肝病毒携带者疗效不佳，其主要原因是这些抗病毒药可以抑制乙肝病毒复制，但不能清除乙肝病毒；对机体的免疫耐受状态的逆转没有肯定的作用. 从发展趋势来看，乙肝病毒治疗性疫苗将成为本世纪对慢性乙肝病毒感染特别是慢性乙肝病毒携带者治疗研究领域的热点，他与现有抗乙肝病

毒药物的联合应用，将成为一种新的治疗方法.

4 参考文献

1 Smith HA, Klinman DM. The regulation of DNA vaccines. *Curr Opin Biotechnol* 2001;12:299-303

2 Evans TG, Bonnez W, Rose RC, Koenig S, Demeter L, Suzich JA, O'Brien D, Campbell M, White WI, Balsley J, Reichman RC. A Phase 1 study of a recombinant viruslike particle vaccine against human papillomavirus type 11 in healthy adult volunteers. *J Infect Dis* 2001;183:1485-1493

3 Zeytin HE, Tripathi PK, Bhattacharya-Chatterjee M, Foon KA, Chatterjee SK. Construction and characterization of DNA vaccines encoding the single-chain variable fragment of the anti-idiotype antibody 1A7 mimicking the tumor-associated antigen disialoganglioside GD2. *Cancer Gene Ther* 2000;7:1426-1436

4 Ferry G. First DNA malaria vaccine on trial in Africa. *Curr Biol* 2000;10:R810-811

5 Hanke T, McMichael AJ. Design and construction of an experimental HIV-1 vaccine for a year-2000 clinical trial in Kenya. *Nat Med* 2000;6:951-955

6 Bendandi M. Anti-idiotype vaccines for human follicular lymphoma. *Leukemia* 2000;14:1333-1339

7 Mincheff M, Tchakarov S, Zoubak S, Loukinov D, Botev C, Altankova I, Georgiev G, Petrov S, Meryman HT. Naked DNA and adenoviral immunizations for immunotherapy of prostate cancer: a phase I/II clinical trial. *Eur Urol* 2000;38:208-217

8 Lee SW, Li H, Strong TV, Moore SE, Conry RM. Development of a polynucleotide vaccine from melanoma antigen recognized by Tcells-1 and recombinant protein from melanoma antigen recognized by T cells-1 for melanoma vaccine clinical trials. *J Immunother* 2000;23:379-386

9 Talwar GP, Diwan M, Razvi F, Malhotra R. The impact of new technologies on vaccines. *Natl Med J India* 1999;12:274-280

10 Lawrence G, Cheng QQ, Reed C, Taylor D, Stowers A, Cloonan N, Rzepczyk C, Smillie A, Anderson K, Pombo D, Allworth A, Eisen D, Anders R, Saul A. Effect of vaccination with 3 recombinant asexual-stage malaria antigens on initial growth rates of Plasmodium falciparum in non-immune volunteers.*Vaccine* 2000;18:1925-1931

11 Boyer JD, Cohen AD, Vogt S, Schumann K, Nath B, Ahn L, Lacy K, Bagarazzi ML, Higgins TJ, Baine Y, Ciccarelli RB, Ginsberg RS, MacGregor RR, Weiner DB. Vaccination of seronegative volunteers with a human immunodeficiency virus type 1 env/rev DNA vaccine induces antigen-specific proliferation and lymphocyte production of beta-chemokines. *J Infect Dis* 2000;181:476-483

12 Stevenson FK. DNA vaccines against cancer: from genes to therapy. *Ann Oncol* 1999;10:1413-1418

13 Orme IM. Beyond BCG:the potential for a more effective TB vaccine. *Mol Med Today* 1999;5:487-492

14 Yuen MF, Lim WL, Cheng CC, Lam SK, Lai CL. Twelve-year follow-up of a prospective randomized trial of hepatitis B recombinant DNA yeast vaccine versus plasma-derived vaccine without booster doses in children. *Hepatology* 1999;29:924-927

15 Lau GK, Carman WF, Locarnini SA, Okuda K, Lu ZM, Williams R, Lam SK. Treatment of chronic hepatitis B virus infection: an Asia-Pacific perspective. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:3-12

16 Steinman RM. Dendritic cells and immune-based therapies. *Exp Hematol* 1996;24:859-862

17 王全楚,周永兴,姚志强,冯志华. 不同载体及靶基因对乙型肝炎病毒DNA疫苗免疫效果的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:289-291

18 吴超,邹全明. 幽门螺杆菌黏膜疫苗的研究进展. 世界华人消化杂志 2000;8:203-205

19 宋志强,郝飞,王永刚,闵峰,王宇明. 丙型肝炎病毒HVR1抗血清体外阻断HCV的感染.世界华人消化杂志 2000;8:171-174

20 杜德伟,周永兴,冯志华,姚志强,李光玉. IL-12及HBV基因疫苗共同免疫小鼠的效果. 世界华人消化杂志 2000;8:128-130

21 李文波,姚志强,周永兴,冯志华. HBV基因疫苗联合抗原蛋白免疫小鼠的研究. 世界华人消化杂志 1999;7:188-190

22 李明松,袁爱力,张万岱,刘思德,吕爱民,周殿元. 树突状细胞体外诱导抗肝癌免疫.世界华人消化杂志 1999;7:161-163

23 Ohr HF, Pingel S, Bocher WO, Bernhard H, Herzog-Hauff S, Rose-John S, GallePR. Reduced virus specific T helper cell induction by autologous dendritic cells in patients with chronic. hepatitis B-restoration by exogenous interleukin-12.*Clin Exp Immunol* 2002;130:107-114

24 Beckebaum S, Cicinnati VR, Dworacki G, Muller-Berghaus J, Stolz D, Harnaha J, Whiteside TL, Thomson AW, Lu L, Fung JJ, Bonham CA. Reduction in the circulating pDC1/pDC2 ratio and impaired function of ex vivo-generated DC1 in chronic hepatitis B infection. *Clin Immunol* 2002;104:138-150

25 Lin CM, Wang FH. Selective modification of antigen-specific CD4(+) T cells by retroviral-mediated gene transfer and in vitro sensitization with dendritic cells. *Clin Immunol* 2002;104:58-66

26 Wang FS, Xing LH, Liu MX, Zhu CL, Liu HG, Wang HF, Lei ZY. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2001;7:537-541

27 Akbar SM, Horiike N, Onji M, Hino O. Dendritic cells and chronic hepatitis virus carriers. *Intervirology* 2001;44:199-208

28 Bocher WO, Dekel B, Schwerin W, Geissler M, Hoffmann S, Rohwer A, Arditti F,Cooper A, Bernhard H, Berrebi A, Rose-John S, Shaul Y, Galle PR, Lohr HF,Reisner Y.Induction of strong hepatitis B virus (HBV) specific T helper cell and cytotoxic T lymphocyte responses by therapeutic vaccination in the trimera mouse model of chronic HBV infection. *Eur J Immunol* 2001; 31:2071-2079

29 Oka Y, Akbar SM, Horiike N, Joko K, Onji M. Mechanism and therapeutic potential of DNA-based immunization against the envelope proteins of hepatitis B virus in normal and transgenic mice. *Immunology* 2001;103:90-97

30 You Z, Huang X, Hester J, Toh HC, Chen SY. Targeting dendritic cells to enhance DNA vaccine potency. *Cancer Res* 2001; 61:3704-3711

Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com

ISSN 1009-3079

© 2018 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.