

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,汪莹怡 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 $\alpha 1$ 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,山本光胜,大槻真 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,毕建威,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,吴本伊,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离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,游晚功,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,李雪松 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 张闯峰,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 姚英氏,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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名

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
黄象谦
黄志强
黎介寿
刘耕陶
裘法祖
汤钊猷
王宝恩
危北海
吴孟超
吴咸中

张金哲
张学庸
赵东海
周殿元
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(PJ)》
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录数据库
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
CN 14-1260/R

邮发代号
82-262

国外代号
M 4481

国内定价
每期 24.00 元 全年 288.00 元

广告经营许可证
1401004000050

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

贾战生,冯志华,周永兴,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
全军医药卫生基金资助项目, No.98D041
国家自然科学基金资助项目, No.39570652
项目负责人:贾战生 710038,陕西省西安市灞桥区新寺路 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.
电话:029-3377752
收稿日期:2002-10-25 接受日期:2002-11-06

摘要

病毒性肝炎是目前严重危害人类健康的最常见的世界性感染性疾病之一,迄今仍无有效的抗病毒药物.抗病毒基因疗法作为一种新的治疗手段,可望从病因上解决病毒性肝炎的治疗问题.本文结合我们自己的研究综述抗肝炎病毒基因疗法的研究现状和面临的挑战,重点介绍抗肝炎病毒核酶和 DNA 免疫的研究.

贾战生,冯志华,周永兴.病毒性肝炎基因治疗的研究和面临的挑战.世界华人消化杂志 2003;11(6):810-814

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/810.asp>

0 引言

病毒性肝炎是目前严重危害人类健康的最常见的世界性感染病.乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)感染容易慢性化,并与肝硬化和肝细胞癌(HCC)的发生密切相关,严重威胁人类身心健康^[1-10].由于 HBV 和 HCV 基因变异和机体对病毒的免疫耐受,导致干扰素和抗病毒核苷类药物的治疗效果也不令人满意^[11-14].因此,寻求新型抗肝炎病毒药物成为迫切需要.

基因治疗技术的发展,为抗肝炎病毒治疗研究提供了新的机遇^[15-17].随着分子生物学技术的发展和人类基因组计划的完成,基因疗法也从过去的治疗遗传性疾病发展到医学的许多领域,如慢性病毒感染^[18-21]、心血管系统疾病^[20,21]、肿瘤^[22-26]、自身免疫性疾病^[27-29]、代谢性疾病^[30,31]等,并取得了突出的进展.基因治疗的定义和内容也随之扩大,即通过转导目的基因达到治疗疾病的目的均属基因治疗范畴.抗病毒性肝炎基因治疗是基因疗法的一个重要分支,尤其在严重威胁人类健康的 HIV、HBV 和 HCV 的研究方面取得了很大进展.目前,用于抗肝炎病毒基因治疗的主要策略包括:反义技术、核酶(ribozymes)^[32,33]、基因免疫^[34-38]、干扰肽或蛋白质^[39]、优势负突变物(dominant negative mutants)、单链抗体等.本文结合我们的研究回顾 10 a 来国内外抗肝炎病毒基因治疗的研究现状和面临的挑战,重点介绍核酶和基因免疫的研究.

1 核酶(ribozyme, Rz)

核酶是生物体内一种具有催化功能的小 RNA 分子,普遍存在于自然界^[40].通过对核酶进行人工设计和改造,人们可以获得自然界罕见的、定向的 RNA 内切酶,用于生物学研究^[41-45].由于核酶具有特异结合靶 RNA 分子,可以干扰或阻断靶基因的复制和表达,并且结构简单,可人工设计合成,因此是当前抗肿瘤和抗病毒基因治疗的重要手段之一,尤其用于慢性持续性病毒感染的基因治疗.1991 年 Saver at al 首先将核酶用于抗人免疫缺陷病毒(HIV)的研究.目前抗 HIV 核酶已进入临床前期研究, Li at al 选用人造血干细胞,来源于胎盘或脐带的 CD34+ 细胞,他们以 10 名新生儿中取来 CD34+ 细胞,用 SCF 因子, IL-3、IL-6 刺激细胞生长,用 MJT 载体表达发夹状核酶,结果表明对正常细胞, HIV 暴露组, HIV 感染组之间生长无明显差异,细胞培养可达 4 wk 以上,用不同的方法都观察到核酶转染细胞可明显抑制 HIV 的复制.他们认为通过转染抗 HIV 核酶 CD34+ 干细胞,可有效阻止 HIV 的感染.美国和澳大利亚已将抗人免疫缺陷病毒核酶用于 I 期和 II 期临床验证,取得了令人满意的效果.1992 年, von-Weizasacher at al 率先开展了抗 HBV 核酶的研究工作.他们选择设计了 3 个锤头结构核酶,在体外转录 HBV 和核酶 RNA 分子,在特定条件下温育,通过丙烯酰胺凝胶电泳和放射性自显影技术显示核酶对靶基因的切割作用,并计算其切割率.作者还证明了多位点核酶联合可提高切割效率,并可用来对抗病毒的变异.随后,世界各地的许多学者先后对 HBV 和 HCV 核酶进行了广泛而深入的研究.2000 年 Zhuang at al^[44]报道,用双位点核酶的真核表达载体,在细胞中表达针对 HBV 的 X 基因的核酶,结果表明不但使 HBV X 蛋白大为下降,而且使 S 抗原亦有下降. Macejak at al^[46]设计了 15 个锤头状核酶,针对 HCV 的 5' TR 区域,在以荧光素酶为报道基因的细胞研究系统中,这 15 个核酶都有抑制活性,从 40-80 % 不等,个别的可达 90 % 以上,提示这是一个潜在的治疗 HCV 感染的方法.

体外研究结果表明,理想的靶序列和切割位点选择是核酶研究的关键,计算机设计和核酶文库是当前选择设计抗病毒核酶的有效方法,锤头结构和发夹结构核酶由于分子较小,容易通过多种途径获得,故成为目前最多选用的两种核酶类型.我们应用上海生物化学研究所陈安农编制的核酶设计软件,成功地设计了抗 HBV C 区基因 mRNA 的三位点核酶,并设计了针对

HCV 5 非编码区(213 和 260 位点)和 C 区(407 和 498 位点)的锤头结构核酶^[46]. Lieber at al 报道, 从核酶文库中筛选的出 6 个针对 HCV RNA 保守序列的锤头结构核酶, 用重组腺病毒载体, 在稳定表达 HCV 基因产物 CHO 细胞和感染 HCV 的患者分离的肝细胞证明, 单个核酶或联合核酶均能降低 HCV RNA 水平. Putlitz at al 学者用重组筛选方法从一个发夹型核酶库中(5×10^5)确定能有效地在转基因人肝癌细胞(HHC)中切割 HBV 前基因组 RNA 的 4 个发夹型核酶. 通过实验发现 HBV RNA 上有 40 个部位可以和核酶结合, 从中选出 17 个在 HBV 所有亚型中都存在的序列, 设计了 4 个发夹形核酶, 与靶基因共转染于 HHC 细胞系. 结果表明:核酶对 HBV 的抑制率分别为 80 %, 69 %, 66 % 和 49 %.

我们于 1996 年开始了抗 HBV 核酶的研究工作^[47]. 首先利用计算机辅助设计了三个针对 HBV C 基因 mRNA 的锤头结构核酶, 在其 5'- 和 3'- 端带有自剪切核酶. 结果表明:该核酶在细胞外能特异切割靶 RNA 分子, 串联或联合核酶切割效率明显高于单个核酶; 在转染 HBV 基因的人肝癌细胞系(2.2.15), 通过脂质体介导的基因转染方法证明, 该核酶可有效抑制 HBeAg 的表达, 其抑制率为 55-66 %. 我们又选择了 HCV 5 非编码区和 C 区, 设计了 4 个锤头结构核酶, 应用基因重组方法构建了带自剪切的核酶真核表达载体(pcDNA3), 与靶基因(pCMVNCRIuc)共转染于人肝癌细胞(HHCC), 以 luc 为报告基因证明, 抗 HCV 5 非编码区核酶可有效抑制病毒的复制, 其抑制率在 40-70 % 之间^[48,49]. 最近, 我们又将抗 HCV 5 非编码区核酶与抗 C 区核酶联合转染, 结果表明联合核酶的抑制活性较单个核酶显著增高. 国内许多学者近年也探讨了不同结构核酶对 HBV 和 HCV 的抗病毒研究. 同济医科大学最近报道设计了带有自剪切的发夹结构核酶, 在体外证明可特异切割 HBV 核心基因^[50]. 第一军医大学也报道设计并构建了 HBV 特异性核酶, 并在体外证明其切割活性^[51]. 上海生化所最近报道他们设计的抗 HBV 锤头结构核酶与靶基因共转染 HepG2 细胞, 发现可有效地抑制 HBV 基因的表达, 其抑制效率与释放的核酶量有关^[52,53]. 由于缺乏肝炎病毒感染的小动物模型, 黑猩猩代价昂贵, 国内抗肝炎病毒核酶的研究患处在细胞水平, 尚未见到动物实验研究报告.

核酶同其他基因治疗技术都受到两个基本技术的限制, 即将目的基因有效地导入靶细胞, 目的基因的表达达到治疗水平^[54]. 抗肝炎病毒核酶导入体内的方法有 2 种策略^[28]: (1)从宿主分离肝细胞, 在体外将核酶基因导入肝细胞, 再将带有核酶的基因移植到宿主肝脏, 这也是当前基因治疗研究的一种有效方法, 随着人骨髓造血干细胞在体外的培养成功可大大促进干细胞基因治疗的发展; (2)直接将核酶真核表达载体通过某种途径到入体内, 该技术简单, 但受到体内分布, 靶细胞内定位等条件的影响. 最近 Lee at al^[55]观察了抗 HCV 5 非编

码区 195 位点的一个核酸抗性核酶在 C57Bl/6 小鼠体内的分布和药代动力学. ³²P 标记的核酶通过皮下或静脉给药, 计量为 10 mg/kg 或 30 mg/kg, 其肝脏的高峰浓度比体外细胞抑制浓度的值高. 该核酶在皮下的吸收达 89 %, 其半衰期为 23 min. 为了确定核酶在靶组织的细胞内定位, 作者应用四甲基罗丹明标记核酶注射小鼠, 15 min-48 h 可在肝组织发现核酶荧光, 静脉途径可达 72 h, 当 15-30 min 时在肝细胞胞核和胞质内均发现绿色荧光. 结果说明该核酶主要由肝细胞摄取, 具有靶细胞“倾向性”.

提高核酶对靶基因的抑制效率一直是研究者们追求的目标. 最近 Macejak at al^[56]报道, 在体外 IFN- α 可增强核酶的抗病毒抑制作用. 作者以 HCV- 脊髓灰质炎病毒嵌合体为靶, 设计了针对 HCV 5' 非编码区核酶, 在 HeLa 细胞证明抗 HCV 核酶、IFN- α 均可有效地抑制病毒的复制, 当联合核酶时 IFN- α 的浓度可减少 5-12.5 倍, 当加入适量的 IFN- α , 核酶的浓度也可减少 3 倍. 结果表明低剂量的 IFN- α 增强核酶的抗病毒作用, 其抑制率达 98 %, 说明 IFN- α 联合抗病毒核酶可能提高治疗效果. 虽然近年来, 有许多核酶药业公司也开始了核酶抗肝炎病毒的研究, 美国 Welch at al 和 Wu at al^[57]的实验室进行了核酶对 HBV 和 HCV 基因治疗的研究, 并拟用于 I 期和 II 期临床试验. 然而, 已报道的研究结果缺乏动物体内的研究, 尚未见人体的研究报道. 核酶在细胞水平对病毒基因表达的抑制作用还不理想, 对机体的毒理作用研究还不够, 需要进一步加强核酶抗肝炎病毒基因治疗的基础和临床研究.

2 基因免疫(gene immunization)

基因免疫又称 DNA 免疫, 由于这种外源基因具有疫苗功能, 又称为 DNA 疫苗, 他是疫苗研究史上的一次革命, 故称之为第三代疫苗^[58]. 由于基因免疫具有预防和治疗病原感染的作用, 又是通过转基因手段实现, 因此, 被认为是一种新的基因治疗策略. 基因免疫与其他基因治疗策略不同, 他通过诱导机体免疫应答实现治疗目的, 并产生持久的免疫力, 而且制备过程简单, 实施治疗容易, 受到广泛重视. 1996-02 在美国联合召开了基因疫苗质量控制与标准化研讨会, 会议制定了基因疫苗临床实验指南. 目前美国食品与药品管理局(FDA)已批准几项有关 HIV、HBV、人乳头瘤病毒(PHV)、疟原虫、流感病毒、结核杆菌等 DNA 疫苗进行临床研究, 其中疟疾 DNA 疫苗在 I 期或 II 期临床研究中均取得满意的保护效果, 已进入 III 期临床, 极有希望获得批准. 1993 年, Davis at al 首先开始了抗 HBV DNA 疫苗的研究. 迄今, 国内外学者先后研究了 HBV 和 HCV 不同基因片段免疫应答效果, 并证明在小鼠体内, 可诱导特异性抗体产生和特异性细胞毒 T(CTL)细胞反应. 我们也研究了 HBV S 片段的免疫应答作用, 并观察了 IL-12 及免疫共刺激序列(CpG)对 DNA 免疫的增强作

用^[59-61].最近 Oka et al^[58] 研究报道,将 HBV S 大蛋白及中蛋白真核表达载体注射转基因小鼠,结果 28/30 只小鼠 HBsAg 清除,而对照组 6/29 只有效.其他研究亦证明,CpG、IL-2 和 IL-12^[62] 均能增强 HBV DNA 免疫效诱导细胞和体液免疫应答.应用 HBV 转基因小鼠,注射 pCMVS2S 可完全清除血浆中的 HBsAg,并能长时间抑制肝细胞表达 HBsAg^[62].他们又将 pCMVS2S 注射黑猩猩,也证明可保护其免受 HBV 感染量的攻击,结果提示应用 HBV 基因免疫可以预防和治疗 HBV 感染,为 HBV DNA 疫苗临床研究奠定重要的实验基础^[62].

HCV 病毒编码被膜蛋白(E)的基因容易发生变异,机体缺乏保护性抗体产生,传统疫苗的研究又遇到一定困难.因此,抗 HCV 基因免疫的研究更具有迫切性和实际意义. Arichi et al^[63] 比较了 6 种 HCV 不同基因区 DNA 疫苗诱导免疫应答的作用,结果表明 6 种重组质粒均能在小鼠体内刺激特异性抗体应答,而 CTL 应答仅在含 C 基因的质粒组中产生.我们选择了 HCV C 或与结合 E1E2 区,构建了真核表达载体,并联合 IL-2 或 IL-12 质粒载体共同免疫小鼠^[64],结果表明 HCV 结构区基因与 pIL-2 联合免疫, HCV 特异性抗体水平升高,而对 CTL 的杀伤作用增强不明显,与 IL-12 质粒共免疫,诱导的抗体反应和 CTL 活性均明显增强,尤以细胞免疫为著,提示 pIL-12 可增加 HCV 特异性细胞免疫反应.我们又应用转染 HCV C 蛋白的 SP2/0 细胞接种小鼠形成 HCV 移植瘤为感染动物模型,观察该质粒免疫对肿瘤形成的影响,发现应用 HCV C 基因免疫可显著抑制发瘤时间、延长存活时间,联合 pIL-12 质粒,可显著增加 HCV DNA 免疫诱导特异 CTL 反应其活性.对 DNA 疫苗诱导免疫应答的机制,以及提高免疫应答效果许多学者进行了多方面的研究^[65-69].大多数学者认为骨骼肌是最有效的摄取外源基因表达蛋白抗原的组织.肌肉组织具有安全、体积大、免疫接种容量大的优点,因此多被用来进行 DNA 免疫注射.肌纤维对外源质粒摄取的具体机制目前还不清楚.可能因骨骼肌具有丰富的 T 小管系统和肌浆网结构使骨骼肌肌纤维直接摄取外源 DNA.有作者用编码虫荧光素酶的质粒 DNA 免疫小鼠后发现,表达的酶活性呈 DNA 剂量依赖关系,而且报道基因可持续表达 19 mo 之久.提示 DNA 肌肉注射免疫可产生持久的免疫应答.此外,肌细胞合成分泌的外源抗原与产生的特异性抗体可以形成抗原-抗体复合物,并沉积于树突状细胞表面,可长效释放 Ag,诱导产生记忆性 T、B 细胞^[70,71].

使编码抗原的基因最佳表达,并诱导机体产生有效地的免疫应答是实现基因免疫抗病毒治疗的成功的关键.因此,国内外学者从多方面探讨增强基因免疫的应答效果,目前的研究策略集中在优化载体、使用肌肉再生剂、与细胞因子共表达、使用免疫刺激序列(CpG)^[68]、应用修饰的树突状细胞(DC)、注射共刺激信号分子及

免疫佐剂等.不同作者均取得了积极的研究结果,为设计新型临床应用 DNA 疫苗提供了理论依据.目前,印度学者已经用 HBV DNA 疫苗注射成人,研究疫苗的安全性及免疫原性^[69].为了使 DNA 疫苗制品的申报有章可循, FDA 在网上公布了《预防感染病的质粒 DNA 疫苗制备要点》(points to consider on plasmid DNA vaccines for preventive infectious disease indications).该要点还对 DNA 疫苗的修饰、佐剂、和免疫器械的使用等做了规定.其主要内容包括:DNA 疫苗制备要点简介, FDA 生物制品评价及研究中心对 DNA 疫苗制品的基本要求和管理办法,申报新药应提供材料的基本要求和管理办法,有效性和安全性评价等.此外,对 DNA 疫苗研制中的靶基因和载体选择、载体的构建和体外转染、动物模型、免疫途径和方法、攻击及保护力的鉴定等相关指标做了规定.在我国官方尚未提出具体规定之前,该要点可为国内 DNA 疫苗研究提供借鉴.若欲了解详细内容,可访问下列网站:<http://www.fda.gov/cber>, <http://www.dnavaccine.com>, <http://www.genweb.com>.

3 挑战和策略

病毒性肝炎基因治疗的研究伴随分子生物技术的发展已走过 10 a 的历程,在基础和临床前研究均已取得了很大进展,显示出某些令人兴奋的前景.但多数研究步入临床过程艰难,在一些发达国家的研究热潮开始趋于缓慢.2000 年,美国《Science》周刊发表法国学者 Cavazzana et al^[72] 的文章,应用转基因方法成功治疗 2 例患严重联合免疫缺陷综合征(severe combined immunodeficiency, SCID)的患儿,使基因疗法重又唤起生机.美国基因治疗研究专家 Anderson et al^[73] 说:当前基因疗法正处于最坏的时刻,也是最好的时刻.结合我们的研究和目前这一领域的进展,还需要在以下几方面进一步加强研究.(1)实现目的基因的高效表达和有控表达:目的基因在细胞内有效抑制是实现抗病毒基因治疗的关键,应从载体和启动子的优化、转送基因方法的改进、与靶基因的共域化(colocation)和有效调控表达、造血干细胞作为基因载体的潜能^[54] 等方面进行深入研究.(2)抗原表位的优化组合:选择 HBV 和 HCV 基因的有效抗原表位,组成 T 细胞、B 细胞表位抗原和辅助性 T 细胞表位复合抗原,产生新的复合表位多肽疫苗,或构建复合表位基因载体,制备 DNA 疫苗,以提高免疫效果^[74].最近,有作者提出建立表达库免疫的思路,可实现选择最有效免疫原部位的优化组合^[75,76].并可用 Th1 和 Th2 细胞因子基因共免疫以改变基因疫苗诱导的免疫反应类型.(3)加强其他基因治疗方法学探讨如细胞内干扰肽或蛋白质,优势负突变物、单链抗体细胞内免疫、IRES 特异性抑制性 RNA 等.探讨 RNA 修复技术在肝炎病毒基因治疗中的应用^[77],研究树突状细胞体外基因修饰对 DNA 免疫的增强作用^[70-80].(4)加强动物实验研究 缺乏人嗜肝病毒感染的小动物模型限制了抗肝炎

病毒药物的发展. HBV和HCV转基因小鼠基因治疗性研究可为临床研究提供依据, 在条件许可下可应用当前唯一对HBV和HCV易感动物 - 黑猩猩作为研究对象进行研究^[81]. 同时应与抗原蛋白联合应用、建立嵌合型或多重抗原DNA疫苗, 以提高基因免疫的保护范围和免疫效果等. (5) 进行人体试验研究在缺乏感染动物模型条件下, 选择志愿者进行临床研究很有必要, 但必须保证其安全性并获得法律上的许可^[82].

基因疗法也同其他医学领域的新技术和方法一样, 如抗生素的产生、单克隆抗体技术、器官移植等, 需要多年时间发展, 不断走向成熟, 从早期的期望, 经过一定的挫折和失败, 最后走向成功^[73]. 要使基因疗法真正用于人类疾病的防治, 仍有一段很长的路要走, 但我们深信, 随着上述研究的不断深入, 必将给人类疾病, 尤其是难治性的慢性疾病如肿瘤、HIV、HBV和HCV感染等, 带来新的治疗契机^[83,84].

4 参考文献

- Pybus OG, Charleston MA, Gupta S, Rambaut A, Holmes EC, Harvey PH. The epidemic behavior of the hepatitis C virus. *Science* 200;292:2323-2325
- Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:51-68
- Ding X, Mizokami M, Yao G, Xu B, Orito E, Ueda R, Nakanishi M. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China. *Intervirology* 2001;44:43-47
- Jieantet D, Chemin I, Mandrand B, Zoulim F, Trepo C, Kay A. Characterization of two hepatitis B virus populations isolated from a hepatitis B surface antigen-negative patient. *Hepatology* 2002;35:1215-1224
- Kenny-Walsh E. The natural history of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2001;5:969-977
- Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J Mol Biol* 2001;313:451-464
- Drazan KE. Molecular biology of hepatitis C infection. *Liver Transpl* 2000;6:396-406
- Koike K, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Kyoji M. Molecular mechanism of viral hepatocarcinogenesis. *Oncology* 2002;62 (Suppl):29-37
- Koike K, Moriya K, Kimura S. Role of hepatitis C virus in the development of hepatocellular carcinoma: Transgenic approach to viral hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:394-400
- Yao F, Terrault N. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Curr Treat Options Oncol* 2001;2:473-483
- Santantonio T, Anna Niro G, Sinisi E, Leandro G, Insalata M, Guastadisegni A, Pastore G. Lamivudine/interferon combination therapy in anti-HBe positive chronic hepatitis B patients: a controlled pilot study. *J Hepatol* 2002;36:799-804
- Wolters LM, Hansen BE, Niesters HG, Zeuzem S, Schalm SW, De Man RA. Viral dynamics in chronic hepatitis B patients during lamivudine therapy. *Liver* 2002;22:121-126
- De Ledinghen V, Trimoulet P, Winnock M, Bernard PH, Bourliere M, Portal I, Remy AJ, Szostak N, Levy S, Tran A, Abergel A, Chene G, Fleury H, Couzigou P. Daily or three times per week interferon alpha-2b in combination with ribavirin or interferon alone for the treatment of patients with chronic hepatitis C not responding to previous interferon alone. *J Hepatol* 2002;36:819-826
- Chiou HC, Lucas MA, Coffin CC, Banaszczyk MG, Ill CR, Lollo CP. Gene therapy strategies for the treatment of chronic viral hepatitis. *Expert Opin Biol Ther* 2001;1:629-639
- Cornberg M, Wedemeyer H, Manns MP. Hepatitis C: therapeutic perspectives. *Forum* 2001;11:154-162
- Lott WB, Takyar SS, Tuppen J, Crawford DH, Harrison M, Sloots TP, Gowans EJ. Vitamin B12 and hepatitis C: molecular biology and human pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4916-4921
- Rodriguez F, Harkins S, Slifka MK, Whitton JL. Immunodominance in virus-induced CD8(+) T-cell responses is dramatically modified by DNA immunization and is regulated by gamma interferon. *J Virol* 2002;76:4251-4259
- Schmitz V, Qian C, Ruiz J, Sangro B, Melero I, Mazzolini G, Narvaiza I, Prieto J. Gene therapy for liver diseases: recent strategies for treatment of viral hepatitis and liver malignancies. *Gut* 2002;50:130-135
- Hirschi KK, Goodell MA. Hematopoietic, vascular and cardiac fates of bone marrow-derived stem cells. *Gene Ther* 2002;9:648-652
- Askari AT, Penn MS. Targeted gene therapy for the treatment of cardiac dysfunction. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2002;14:167-177
- Park KI, Ourednik J, Ourednik V, Taylor RM, Aboody KS, Auguste KI, Lachyankar MB, Redmond DE, Snyder EY. Global gene and cell replacement strategies via stem cells. *Gene Ther* 2002;9:613-624
- Havlik R, Jiao LR, Nicholls J, Jensen SL, Habib NA. Gene therapy for liver metastases. *Semin Oncol* 2002;29:202-208
- Kaneda Y. Gene therapy: a battle against biological barriers. *Curr Mol Med* 2001;1:493-499
- Ruiz J, Mazzolini G, Sangro B, Qian C, Prieto J. Gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis* 2001;19:324-332
- Sly WS, Vogler C. Brain-directed gene therapy for lysosomal storage disease: going well beyond the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5760-5762
- Lee JH, Ku JL, Park YJ, Lee KU, Kim WH, Park JG. Establishment and characterization of four human hepatocellular carcinoma cell lines containing hepatitis B virus DNA. *World J Gastroenterol* 1999;5:289-295
- Melo ME, Qian J, El-Amine M, Agarwal RK, Soukhareva N, Kang Y, Scott DW. Gene transfer of Ig-fusion proteins into B cells prevents and treats autoimmune diseases. *J Immunol* 2002;168:4788-4795
- Ni YH. In vivo hepatic gene therapy. *Acta Paediatr Taiwan* 2001;42:191-200
- Yang Z, Chen M, Wu R, Fialkow LB, Bromberg JS, McDuffie M, Naji A, Nadler JL. Suppression of autoimmune diabetes by viral IL-10 gene transfer. *J Immunol* 2002;168:6479-6485
- Yamaoka T. Gene therapy for diabetes mellitus. *Curr Mol Med* 2001;1:325-337
- Qin XY, Shen KT, Zhang X, Cheng ZH, Xu XR, Han ZG. Establishment of an artificial beta-cell line expressing insulin under the control of doxycycline. *World J Gastroenterol* 2002;8:367-370
- Feng Y, Kong Y, Wang Y, Qi G. Antiviral activity of a hammerhead ribozyme against HBV in HepG2.2.15 cells. *Shengwu Xue Yue Shengwu Xue Bao* 2002;34:204-208
- Kruger M, Beger C, Welch PJ, Barber JR, Wong-Staal F. C-SPACE (cleavage-specific amplification of cDNA ends): a novel method of ribozyme-mediated gene identification. *Nucleic Acids Res* 2001;29:94
- Heijtkink RA, van Bergen P, van Roosmalen MH, Sunnen CM, Paulij WP, Schalm SW, Osterhaus AD. Anti-HBs after hepatitis B immunization with plasma-derived and recombinant DNA-derived vaccines: binding to mutant HBsAg. *Vaccine* 2001;19:3671-3680
- Amara RR, Villinger F, Altman JD, Lydy SL, O'Neil SP, Staprans SI, Montefiori DC, Xu Y, Herndon JG, Wyatt LS, Candido MA, Kozyl NL, Earl PL, Smith JM, Hsue HL, Grimm BD, Hulse ML, Miller J, McClure HM, McNicholl JM, Moss B, Robinson HL. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 2001;292:69-74
- Jin J, Yang JY, Liu J, Kong YY, Wang Y, Li GD. DNA immunization with fusion genes encoding different regions of hepatitis C virus E2 fused to the gene for hepatitis B surface antigen elicits immune responses to both HCV and HBV. *World J Gastroenterol* 2002;8:505-510
- Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu Rev Immunol* 2000;18:927-974
- Cochlovius B, Stassar MJ, Schreurs MW, Benner A, Adema GJ.

- Oral DNA vaccination: antigen uptake and presentation by dendritic cells elicits protective immunity. *Immunol Lett* 2002;80:89-96
- 39 Lazdina U, Hultgren C, Frelin L, Chen M, Lodin K, Weiland O, Leroux-Roels G, Quiroga JA, Peterson DL, Milich DR, Sallberg M. Humoral and CD4(+) T helper (Th) cell responses to the hepatitis C virus non-structural 3 (NS3) protein: NS3 primes Th1-like responses more effectively as a DNA-based immunogen than as a recombinant protein. *J Gen Virol* 2001;82(Pt6):1299-1308
 - 40 Yamamoto M, Hayashi N, Takehara T, Ueda K, Mita E, Tatsumi T, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M. Intracellular single-chain antibody against hepatitis B virus core protein inhibits the replication of hepatitis B virus in cultured cells. *Hepatology* 1999;30:300-307
 - 41 Wilson WD, Li K. Targeting RNA with small molecules. *Curr Med Chem* 2000;7:73-98
 - 42 Fedor MJ. The role of metal ions in RNA catalysis. *Curr Opin Struct Biol* 2002;12:289-295
 - 43 Wang DY, Lai BH, Sen D. A general strategy for effector-mediated control of RNA-cleaving ribozymes and DNA enzymes. *J Mol Biol* 2002;318:33-43
 - 44 Zhuang X, Kim H, Pereira MJ, Babcock HP, Walter NG, Chu S. Correlating structural dynamics and function in single ribozyme molecules. *Science* 2002;296:1473-1476
 - 45 Weinberg M, Passman M, Kew M, Arbutnot P. Hammerhead ribozyme-mediated inhibition of hepatitis B virus X gene expression in cultured cells. *J Hepatol* 2000;33:142-151
 - 46 Macejak DG, Jensen KL, Jamison SF, Domenico K, Roberts EC, Chaudhary N, von Carlowitz I, Bellon L, Tong MJ, Conrad A, Pavco PA, Blatt LM. Inhibition of hepatitis C virus (HCV)-RNA-dependent translation and replication of a chimeric HCV poliovirus using synthetic stabilized ribozymes. *Hepatology* 2000;31:769-776
 - 47 贾战生,周永兴,连建奇,冯志华,李光玉,张文彬. 抗丙型肝炎病毒锤头结构核酶的计算机设计. 世界华人消化杂志 1999;7:300-302
 - 48 李谨革,周永兴,连建奇,贾战生,冯志华. 核酶对乙型肝炎病毒细胞内抑制作用. 中华内科杂志 2000;39:27-31
 - 49 贾战生,周永兴,连建奇,冯志华. 锤头结构核酶在肝癌细胞内对丙型肝炎病毒基因表达的抑制作用. 中华医学杂志 1999;79:631-632
 - 50 贾战生,周永兴,连建奇,冯志华. 抗 HCV 5' 非编码区核酶对病毒基因表达翻译启动的抑制作用. 中华传染病杂志 2000;18:10-12
 - 51 Song YH, Lin JS, Liu NZ, Kong XJ, Xie N, Wang NX, Jin YX, Liang KH. Anti-HBV hairpin ribozyme-mediated cleavage of target RNA in vitro. *World J Gastroenterol* 2002;8:91-94
 - 52 Wen SJ, Xiang KJ, Huang ZH, Zhou R, Qi XZ. Construction of HBV-specific ribozyme and its recombinant with HDV and their cleavage activity in vitro. *World J Gastroenterol* 2000;6:377-380
 - 53 Feng Y, Kong YY, Wang Y, Qi GR. Inhibition of hepatitis B virus by hammerhead ribozyme targeted to the poly(A) signal sequence in cultured cells. *Biol Chem* 2001;382:655-660
 - 54 Van Tendeloo VF, Van Broeckhoven C, Berneman ZN. Gene therapy: principles and applications to hematopoietic cells. *Leukemia* 2001;15:523-544
 - 55 Lee PA, Blatt LM, Blanchard KS, Bouhana KS, Pavco PA, Bellon L, Sandberg JA. Pharmacokinetics and tissue distribution of a ribozyme directed against hepatitis C virus RNA following subcutaneous or intravenous administration in mice. *Hepatology* 2000;32:640-646
 - 56 Macejak DG, Jensen KL, Pavco PA, Phipps KM, Heinz BA, Colacino JM, Blatt LM. Enhanced antiviral effect in cell culture of type 1 interferon and ribozymes targeting HCV RNA. *J Viral Hepat* 2001;8:400-405
 - 57 Wu CH, Shen L, Wu GY. Gene therapy applications in gastroenterology and hepatology. *Can J Gastroenterol* 2000;14:57-61
 - 58 Oka Y, Fazle 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
 - 59 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
 - 60 杜德伟,周永兴,冯志华,李光玉,姚志强. 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
 - 61 杜德伟,周永兴,冯志华,李光玉,姚志强. 基因疫苗诱导小鼠抗 HBV 皮下移植瘤免疫研究. 世界华人消化杂志 1999;7:955-957
 - 62 Gherardi MM, Ramirez JC, Esteban M. Towards a new generation of vaccines: the cytokine IL-12 as an adjuvant to enhance cellular immune responses to pathogens during prime-booster vaccination regimens. *Histol Histopathol* 2001;16:655-667
 - 63 Arichi T, Saito T, Major ME, Belyakov IM, Shirai M, Engelhard VH, Feinstone SM, Berzofsky JA. Prophylactic DNA vaccine for hepatitis C virus (HCV) infection: HCV-specific cytotoxic T lymphocyte induction and protection from HCV-recombinant vaccinia infection in an HLA-A2.1 transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:297-302
 - 64 冯志华,周永兴,贾战生,李谨革,连建奇. 丙型肝炎病毒核心基因免疫诱导细胞免疫应答研究. 中华内科杂志 1999;38:462-464
 - 65 Kwon TK, Park JW. Intramuscular co-injection of naked DNA encoding HBV core antigen and Flt3 ligand suppresses anti-HBc antibody response. *Immunol Lett* 2002;81:229-234
 - 66 Ou-Yang P, Hwang LH, Tao MH, Chiang BL, Chen DS. Co-delivery of GM-CSF gene enhances the immune responses of hepatitis C viral core protein-expressing DNA vaccine: role of dendritic cells. *J Med Virol* 2002;66:320-328
 - 67 Brinster C, Muguet S, Lone YC, Boucreux D, Renard N, Fournillier A, Lemonnier F, Inchauspe G. Different hepatitis C virus nonstructural protein 3 (Ns3)-DNA-expressing vaccines induce in HLA-A2.1 transgenic mice stable cytotoxic T lymphocytes that target one major epitope. *Hepatology* 2001;34:1206-1217
 - 68 Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002;20:709-760
 - 69 Bapat S, Joshi D, Naik SS, Bavdekar A, Bhav S, Pandit A. Hepatitis B immunization in adolescent girls. *Indian Pediatr* 2001;38:1160-1162
 - 70 Cho JH, Youn JW, Sung YC. Cross-priming as a predominant mechanism for inducing CD8(+) T cell responses in gene gun DNA immunization. *J Immunol* 2001;167:5549-5557
 - 71 Mumper RJ, Ledebur HC Jr. Dendritic cell delivery of plasmid DNA. Applications for controlled genetic immunization. *Mol Biotechnol* 2001;19:79-95
 - 72 Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL, Fischer A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000;288:669-672
 - 73 Anderson WF. Gene therapy: the best of times, the worst of times. *Science* 2000;288:627-629
 - 74 Yang W, Jackson DC, Zeng Q, McManus DP. Multi-epitope schistosome vaccine candidates tested for protective immunogenicity in mice. *Vaccine* 2000;19:103-113
 - 75 Singh RA, Wu L, Barry MA. Generation of genome-wide CD8 T cell responses in HLA-A*0201 transgenic mice by an HIV-1 ubiquitin expression library immunization vaccine. *J Immunol* 2002;168:379-391
 - 76 Moore RJ, Lenghaus C, Sheedy SA, Doran TJ. Improved vectors for expression library immunization- application to Mycoplasma hyopneumoniae infection in pigs. *Vaccine* 2001;20:115-120
 - 77 Watanabe T, Sullenger BA. RNA repair: a novel approach to gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2000;44:109-118
 - 78 Steinman RM, Pope M. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. *J Clin Invest* 2002;109:1519-1526
 - 79 Smith SG, Patel PM, Porte J, Selby PJ, Jackson AM. Human dendritic cells genetically engineered to express a melanoma polyepitope DNA vaccine induce multiple cytotoxic T-cell responses. *Clin Cancer Res* 2001;7:4253-4261
 - 80 Coombes BK, Mahony JB. Dendritic cell discoveries provide new insight into the cellular immunobiology of DNA vaccines. *Immunol Lett* 2001;78:103-111
 - 81 Pancholi P, Lee DH, Liu Q, Tackney C, Taylor P, Perkus M, Andrus L, Brotman B, Prince AM. DNA prime/canarypox boost-based immunotherapy of chronic hepatitis B virus infection in a chimpanzee. *Hepatology* 2001;33:448-454
 - 82 Dahmen A, Herzog-Hauff S, Bocher WO, Galle PR, Lohr HF. Clinical and immunological efficacy of intradermal vaccine plus lamivudine with or without interleukin-2 in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol* 2002;66:452-460
 - 83 Zheng B, Woo PC, Ng M, Tsoi H, Wong L, Yuen K. A crucial role of macrophages in the immune responses to oral DNA vaccination against hepatitis B virus in a murine model. *Vaccine* 2001;20:140-147
 - 84 Shetty K, Wu GY, Wu CH. Gene therapy of hepatic diseases: prospects for the new millennium. *Gut* 2000;46:136-139



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

