

# HBV 慢性感染患者 PBMC 凋亡与血清病毒载量

宋蕊, 王玉梅, 石理兰, 冯国和, 马力, 窦晓光

宋蕊, 王玉梅, 石理兰, 冯国和, 窦晓光, 中国医科大学第二临床学院感染科 辽宁省沈阳市 110004  
马力, 中国医科大学第二临床学院传染科实验室 辽宁省沈阳市 110004  
宋蕊, 女, 1974-01-14 生, 陕西省西安市人, 汉族, 2001 年中国医科大学第二临床学院传染科硕士研究生, 主要从事病毒性肝炎的研究。  
项目负责人: 宋蕊, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学第二临床学院感染科实验室. song\_rui2002@yahoo.com.cn  
电话: 024-83956981  
收稿日期: 2004-03-31 接受日期: 2004-04-27

## Relationship between PBMC apoptosis and serum HBV level in HBV positive patients

Rui Song, Yu-Mei Wang, Li-Lan Shi, Guo-He Feng, Li Ma, Xiao-Guang Dou

Rui Song, Yu-Mei Wang, Li-Lan Shi, Guo-He Feng, Li Ma, Xiao-Guang Dou, Department of Infectious Diseases, the Second Clinical Collage, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China  
Correspondence to: Rui Song, Department of Infectious Disease, the Second Clinical Collage, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. song\_rui2002@yahoo.com.cn  
Received: 2004-03-31 Accepted: 2004-04-27

## Abstract

**AIM:** To investigate the relationship between the serum HBV DNA quantification and the PBMCs apoptosis of the chronic hepatitis B.

**METHODS:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from 10 healthy blood donors and 42 patients with HBV positive. PBMCs were cultured with PHA for 72 h *in vitro*. Then we used TUNEL and flow cytometry to assay the apoptosis. The HBV-DNA extracted from the serum in patients by PCR was quantified by ELISA. We used the one way ANOVA to analysis the apoptosis and the HBV-DNA quantity, and made correlation analysis between the apoptosis and the HBV-DNA quantity.

**RESULTS:** We identified the apoptosis by TUNEL and flow cytometry in cultured PBMCs. The apoptosis rate in mild type of chronic hepatitis B, moderate type of chronic hepatitis B and cirrhosis were (29.3±9.3%, 24.8±10.8%, 28.8±5.0%), compared to the healthy group (18.0±6.4%). Serum HBV-DNA level was the highest in mild type of chronic hepatitis B (14.3±24.8×10<sup>7</sup>cp/L), which was higher than other groups ( $P < 0.05$ ). The serum HBV-DNA level in mild type of chronic hepatitis B is the highest. The serum HBV-DNA level had the correlation with the apoptosis in PBMC ( $r = 0.338$ ,  $P = 0.014$ ).

**CONCLUSION:** There is apoptosis in PBMC of the HBV chronic infections. The serum virus level is the highest in mild type of chronic hepatitis B, while its apoptosis is also the highest. The immune and HBV virus persistent condition are related to the apoptosis. The percentage of the apoptosis in PBMC

has the correlation with the virus level in serum of the HBV chronic infections.

Song R, Wang YM, Shi LL, Feng GH, Ma L, Dou XG. Relationship between PBMC apoptosis and serum HBV level in HBV positive patients. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(7):1574-1577

## 摘要

**目的:** 研究HBV慢性感染患者血清HBV载量与外周血单个核细胞(PBMC)凋亡的关系。

**方法:** 无菌条件下分离42例HBV阳性患者及健康献血员10名外周血单个核细胞(PBMC), 在PHA的刺激下培养72 h后收集细胞。采用脱氧核糖核酸末端标记方法(terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated biotinylated dUTP nick-end labeling, TUNEL)、流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测 HBV 慢性感染患者 PBMC 凋亡, 并用 HBV-PCR 定量试剂盒检测血清 HBV-DNA 的含量。对不同组的 PBMC 凋亡及血清 HBV-DNA 含量进行单因素方差分析, 并对凋亡情况及血清 HBV-DNA 含量进行相关性分析。

**结果:** TUNEL 法与 FCM 检测 HBV 阳性患者 PBMC, 证实 PBMC 存在凋亡, 慢性乙型肝炎轻度组、中度组与肝硬化组凋亡率明显升高分别为(29.3 ± 9.3%, 24.8 ± 10.8%, 28.8 ± 5.0%), 与健康对照(18.0 ± 6.4%)比较凋亡率显著升高( $P < 0.05$ )。血清 HBV-DNA 含量在慢性乙型肝炎轻度组最高(14.3 ± 24.8 × 10<sup>7</sup>cp/L), 与其他组比较病毒含量明显增高( $P < 0.05$ )。HBV 慢性感染患者血清病毒载量与其 PBMC 凋亡率有一定的相关性,  $r = 0.338$ ,  $P = 0.014$  ( $P < 0.05$ )。

**结论:** HBV 慢性感染患者 PBMC 存在凋亡, 其凋亡率较健康组明显增加。慢性乙型肝炎轻度患者血清病毒含量最高, 其凋亡率亦最高。凋亡状况与乙型肝炎的慢性化、机体的免疫状态相关。HBV 慢性感染患者 PBMC 凋亡与其血清病毒载量有相关性。

宋蕊, 王玉梅, 石理兰, 冯国和, 马力, 窦晓光. HBV 慢性感染患者 PBMC 凋亡与血清病毒载量. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1574-1577

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1574.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)常导致慢性感染, 易发展为重型肝炎<sup>[1]</sup>。其慢性化、重型化的机制均与机体的免疫功能异常密切相关, 这种异常是否与活化的淋巴细胞凋亡有关目前尚不完全清楚<sup>[2]</sup>。目前认为, HBV 本身对肝细

胞无直接致病作用, 而 HBV 所致的免疫损伤可能是乙型肝炎重要的发病机制之一<sup>[3]</sup>. HBV 为泛嗜性病毒, 在肝外组织细胞尤其是外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)中可以复制<sup>[4]</sup>. 有研究发现在 PBMC 中存在 HBV 的高度盘卷的 cccDNA<sup>[5]</sup>, 提示 PBMC 可以作为 HBV 转录和翻译的场所<sup>[6]</sup>. 我们采用脱氧核糖核酸末端标记方法 (terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated biotinylated dUTP nick-end labeling, TUNEL) 与流式细胞术(flow cytometry, FCM) 检测 PBMC 的凋亡状态, 并采用 HBV-DNA 定量 PCR 检测试剂盒检测血清 HBV-DNA 含量, 通过对 PBMC 凋亡的检测及患者血清 HBV-DNA 病毒量的检测, 探讨 PBMC 凋亡与 HBV 慢性感染患者血清 HBV 病毒载量的关系, 阐明 PBMC 凋亡在 HBV 慢性感染患者发病机制中的作用.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 中国医科大学附属第二医院感染科 HBV 阳性患者 42 例, 健康对照 10 名, 男 39 例, 女 13 例, 年龄 18-64(平均 38 岁). 诊断均符合 2000 年西安会议“病毒性肝炎防治方案”的诊断标准. 根据临床指标及症状分为 5 组, HBV 携带者 9 例, 慢性乙型肝炎轻度组 10 例, 慢性乙型肝炎中度组 8 例, 慢性乙型肝炎重度组 7 例, 肝炎后肝硬化组(HBV 阳性)8 例. HBsAg 及抗 HBc-IgG 均阳性, 排除 HAV, HCV, HDV 和 HEV 感染, 排除近 3 mo 应用糖皮质激素、干扰素等影响免疫功能药物的患者. 淋巴细胞分离液(上海生化二厂)、RPMI 1640 培养液及新生小牛血清(GIBCO 公司)、植物血凝素(PHA)(广州生物制剂公司)、RNA 酶(武汉博士德生物制品有限公司)、细胞凋亡检测试剂盒(cell death detection kit, POD)(武汉博士德生物制品有限公司)、PI 染液(Sigma 公司)、流式细胞仪(美国 Beclon-Dickinson 公司产品)、HBV-DNA 定量 PCR 检测采用乙型肝炎病毒(HBV)核酸扩增(PCR)酶免疫定量(ELISA)试剂盒(上海浩源生物科技有限公司).

**1.2 方法** 无菌抽取 HBV 阳性患者空腹静脉血 8 mL, 肝素抗凝 6 mL. 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞, 分离血清 2 mL. 应用 HBV-DNA 定量检测试剂盒检测血清 HBV-DNA 含量(方法按说明书). 用含 10 mL/L 新牛血清的 RPMI-1640 培养液稀释提取细胞成  $1 \times 10^6$  /mL, 加入 PHA 100  $\mu$ g, 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱温育 72 h, 收取培养细胞.

**1.2.1 凋亡的检测** TUNEL 法: 细胞凋亡检测试剂盒(cell death detection kit, POD). 将培养的细胞收集, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 去上清, 留细胞沉淀, 将细胞涂片, 并用 40 g/L 多聚甲醛固定. 细胞涂片用 3 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温处理 10 min. 蒸馏水洗涤 2 min 3 次. 加入 Proteinase K 37 $^{\circ}$ C 消化 3 min. 0.1 mol/L PBS 洗 2 min 3 次. 加标记缓冲液, 置湿盒中, 37 $^{\circ}$ C 标记 2 h. 0.1 mol/L PBS 洗 2 min 3 次. 加封闭液, 室温 30 min, 甩掉封闭液, 加生物素化

抗地高辛抗体 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min. 0.1 mol/L PBS 洗 2 min 3 次. 加 SABC, 37 $^{\circ}$ C 60 min 反应. 0.1 mol/L PBS 洗 5 min 4 次. DAB 显色, 苏木素复染. 脱水、透明, 封片. 流式细胞仪检测(Flow Cytometry FCM): 收取培养的细胞, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 加 700 mL/L 乙醇 1 mL -20 $^{\circ}$ C 固定过夜. 离心去掉固定液, 再用 PBS 洗涤细胞 2 次, 加 RNA 酶(1 g/L)20  $\mu$ L 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 加入 PI (50 mg/L) 500  $\mu$ L, 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 以上后上流式细胞仪. 以 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 峰左侧出现的亚二倍体细胞群峰型来检测凋亡的细胞, 每次计数  $10^5$  个细胞.

**1.2.2 HBV-PCR 定量检测** 取血清 20  $\mu$ L+ 病毒裂解液 20  $\mu$ L, 混匀 37 $^{\circ}$ C 1 h, 加入样品中和液 40  $\mu$ L, 混匀. 取出 15  $\mu$ L 加入盛有 15  $\mu$ L 主反应液的薄壁反应管中, 加入扩增液进行 PCR 反应. 反应后加入变性液 30  $\mu$ L, 混匀, 加入杂交液 100  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 1 h. 洗板 5 次, 控干然后加酶联液 100  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 15 min. 再次洗板, 控干, 加入显色液 100  $\mu$ L, 避光 10 min, 加终止液 100  $\mu$ L, 酶标仪读数.

## 2 结果

**2.1 TUNEL 法检测 PBMC 凋亡结果** (图 1, 表 1), FCM

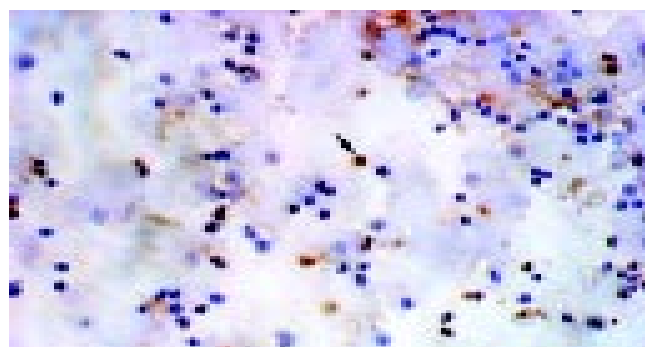


图 1 凋亡细胞胞核染色质特异性棕黄色 (40 $\times$ ).

表 1 PBMC 凋亡率检测 TUNEL 法计数结果(mean $\pm$ SD, %)

分组	n	TUNEL 凋亡率	PI 凋亡率	血清 HBV-DNA 定量( $\times 10^7$ )cp/mL
对照(健康)	10	0.6 $\pm$ 0.4	18.0 $\pm$ 6.4	-
HBV 携带	9	2.5 $\pm$ 1.2	20.2 $\pm$ 6.3	2.3 $\pm$ 4.4
CHB 轻度	10	9.1 $\pm$ 0.9 <sup>ab</sup>	29.3 $\pm$ 9.3 <sup>ab</sup>	14.3 $\pm$ 24.8 <sup>e</sup>
CHB 中度	8	4.3 $\pm$ 1.5 <sup>c</sup>	24.8 $\pm$ 10.8 <sup>c</sup>	6.5 $\pm$ 6.2
CHB 重度	7	1.0 $\pm$ 0.8	15.2 $\pm$ 5.0	1.1 $\pm$ 0.8
肝硬化	8	7.6 $\pm$ 2.2 <sup>ab</sup>	28.8 $\pm$ 5.0 <sup>ab</sup>	4.0 $\pm$ 8.2

<sup>a</sup>P < 0.05 vs 重度, <sup>b</sup>P < 0.01 vs 对照, <sup>c</sup>P < 0.05 vs 健康, <sup>d</sup>P < 0.05 vs 重度.

检测 PBMC 凋亡结果(图 2 表 1), 血清 HBV-DNA 含量的检测结果(表 1). HBV 阳性患者 PBMC 存在凋亡, HBV 阳性患者 PBMC 凋亡率均较健康组高, 慢性乙型肝炎轻度组与肝硬化组凋亡率明显升高与健康组比较 P < 0.01,

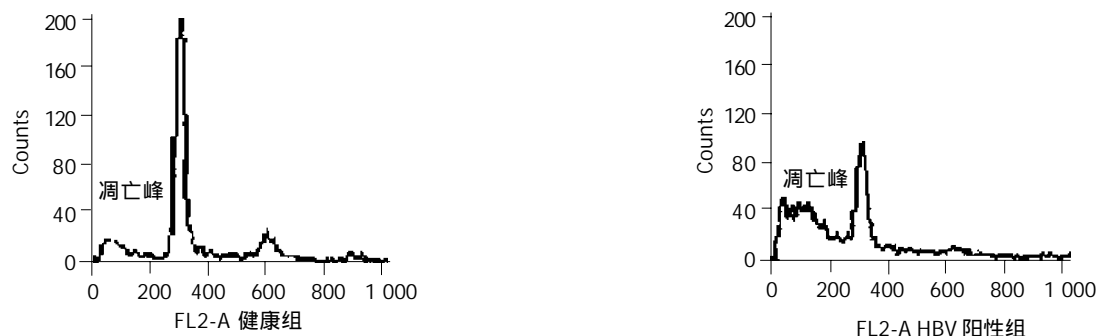


图2 HBV 阳性患者 PBMC G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 峰前凋亡的亚二倍体峰明显高于正常。

与重度组相比  $P < 0.05$ ; 慢性乙型肝炎中度组凋亡率亦升高与健康组比较  $P < 0.05$ ; 慢性乙型肝炎轻度组凋亡率最高; 重度组与 HBV 携带组凋亡率亦增高, 但与健康组比较  $P > 0.05$ . 轻度组的血清 HBV-DNA 含量最高, 与重度组相比  $P < 0.05$ ; 与其他组比较  $P > 0.05$ .

2.2 血清 HBV-DNA 含量与 PBMC 凋亡率相关性结果 (图3) PBMC 凋亡率与血清 HBV-DNA 含量有相关性, 相关系数  $r = 0.338$ ,  $P = 0.014$ .

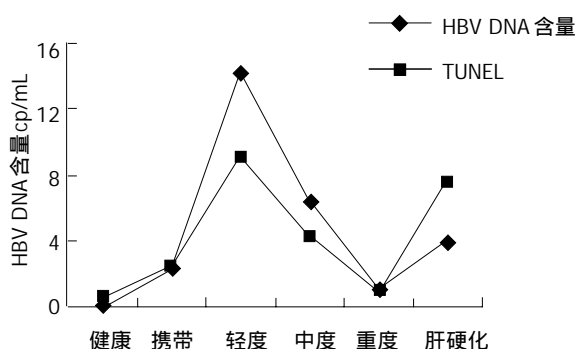


图3 HBV-DNA 含量与凋亡率。

### 3 讨论

HBV 本身并不直接导致肝细胞损伤, 病毒的复制和病毒抗原的表达可激发机体的免疫反应造成肝脏细胞炎症<sup>[7]</sup>, 多数研究认为 HBV 引起的慢性肝炎主要是免疫损伤所致, 乙型肝炎感染免疫状态研究对于进一步分析乙型肝炎的发病机制有重要的作用<sup>[8]</sup>. 自 1972 年 Kerr et al 明确了细胞凋亡(apoptosis)的概念以来, 许多学者对病毒性肝炎肝细胞凋亡进行了广泛研究<sup>[9]</sup>. 动物实验研究表明, 肝细胞凋亡是肝衰竭的一个早期过程<sup>[10]</sup>. 肝细胞凋亡与慢性乙型肝炎患者病理损伤有关, 但这些研究都停留在单纯探讨肝细胞凋亡方面, 而其他细胞凋亡与肝病关系研究尚少<sup>[11]</sup>. 有研究报道新鲜分离的外周血淋巴细胞对凋亡抵抗性很强, 几乎不能见凋亡细胞<sup>[12]</sup>, 本研究应用 TUNEL 及 FCM 检测乙型肝炎患者 PBMCs 凋亡, 实验结果表明 PBMCs 培养后检测到凋亡, 未培养的 PBMCs 未检测到凋亡(预实验检测新鲜提取的 PBMCs 未检测到凋亡). 有研究提出在体内凋亡小体很快被周围巨噬细胞所吞噬, 相反, 在体外, 巨噬细

胞接触凋亡小体机会减少, 因此在培养细胞中凋亡增加<sup>[13]</sup>, 本研究结果也证实了这一点.

在 PHA 等丝裂原刺激培养过程中 PBMC 逐渐对 PHA 等再刺激诱导的凋亡敏感, 这种淋巴细胞经活化后再发生凋亡的现象称为活化诱导的细胞死亡(activation-induced cell death, AICD)<sup>[14]</sup>. AICD 与免疫功能的负调节有密切关系, 活化的淋巴细胞能否及时清除对于调节机体免疫反应应答程度起了重要作用<sup>[15]</sup>. 一方面, 感染细胞凋亡是机体细胞免疫清除病毒感染的一种手段, 另一方面, 病毒可利用调节反应性淋巴细胞凋亡等手段力求在体内繁殖、复制及弥散<sup>[16]</sup>. 但迄今有关慢性乙型肝炎免疫细胞状态和淋巴细胞凋亡的关系尚不清楚<sup>[17]</sup>. 细胞凋亡与免疫学之间存在着极为密切的关系, 如参与免疫系统的发育调节; 参与免疫反应的调节, 外周 T、B 细胞在被激活同时, 也启动了凋亡控制系统; 参与 T 细胞介导的杀伤机制, 包括诱导靶细胞凋亡<sup>[18]</sup>. 血清 HBV-DNA 含量高低反映了病毒在体内复制水平<sup>[19]</sup>. 乙型肝炎病变活动是宿主免疫对病毒及其抗原的应答状态<sup>[20]</sup>. 在对抗病毒感染过程中, 细胞免疫起了重要作用<sup>[21]</sup>. PBMC 是 T、B 淋巴细胞、单核巨噬细胞及自然杀伤细胞等免疫活性细胞的集合体, 在机体免疫反应尤其是细胞免疫反应中起重要的作用<sup>[22]</sup>. 在肝炎发病过程中, 肝炎病毒侵犯 PBMC 使其发生免疫反应可能引起机体免疫紊乱, 成为慢性肝炎发病原因之一<sup>[23]</sup>. 因此研究肝炎病毒感染的 PBMCs 有助于对肝炎病毒的致病机制进行深入研究<sup>[24]</sup>.

我们发现, 在 HBV 慢性感染患者 PBMC 中存在凋亡, 其凋亡率均较健康对照组增高, 而慢性乙型肝炎轻度及肝硬化组 PBMC 凋亡率较健康组明显增高 ( $P < 0.01$ ). 慢性乙型肝炎患者轻度组血清病毒载量与其他组比较亦最高, 与重度组比较差异有显著性 ( $P < 0.05$ ). 本试验证明, HBV 慢性感染患者 PBMC 凋亡率与血清病毒载量有相关性. 考虑 HBsAg 携带者处于免疫耐受阶段, 病毒处于相对静止状态, HBV 慢性化主要是人体细胞免疫功能低下所致, 故凋亡较低. 慢性乙型肝炎轻度患者处于免疫耐受的高复制期, HBV 复制活跃, 病毒量与病变程度成反比, 病毒复制水平较高, 肝内病变以变性为主, 凋亡较高. 随着感染的持续, 病毒复制水平逐

渐降低<sup>[25]</sup>, 肝内病变以变性和坏死同时存在. 在重度组, 肝细胞以坏死为主, 反应性淋巴细胞活化低下, 淋巴细胞耗竭, 因此其 PBMC 的凋亡率下降. AICD 调节是一种生理性调节机制, 可限制淋巴细胞发生过强过度的免疫反应, 但同时可致外周免疫耐受<sup>[26]</sup>, 结果显示 HBV 慢性感染患者 PBMC 存在 AICD 现象. 在肝细胞损伤的过程中, 肝细胞凋亡由 T 细胞活化的抗原识别启动抗原非特异性效应子的级联系统, 在 HBV 慢性感染患者中阻止肝细胞肿瘤发生<sup>[27]</sup>.

本实验从慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞凋亡及血清 HBV 病毒载量的情况, 分析了 HBV 慢性感染患者免疫状况, 为 HBV 慢性感染的发病机制提供了一定的依据. 今后将对 PBMC 中 HBV-DNA 载量与 PBMC 凋亡的关系进行进一步研究.

#### 4 参考文献

- Rivero M, Crespo J, Fabrega E, Casafont F, Mayorga M, Gomez-Fleitas M, Pons-Romero F. Apoptosis mediated by the Fas system in the fulminant hepatitis by hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 2002;9:107-113
- Benedict C, Norris PS, Ware CF. To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nat Immunol* 2002;3:1013-1013
- Pasquetto V, Wieland S, Chisari FV. Intracellular hepatitis B virus nucleocapsids survive cytotoxic T-lymphocyte-induced apoptosis. *J Virol* 2000;74:9792-9796
- 施军平, 郑亚琴, 陈海英. 慢乙肝患者 PBMC 中 HBV-DNA 存在状态的测定及其临床意义. 临床肝胆病杂志 2001;17:227-228
- Cabrero M, Bartolome inverted question mark J, Caramelo C, Barril G, Carreno V. Molecular analysis of hepatitis B virus DNA in serum and peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B surface antigen-negative cases. *Hepatology* 2000;32:116-123
- Lee JY, Chae DW, Kim SM, Nam ES, Jang MK, Lee JH, Kim HY, Yoo JY. Expression of FasL and perforin/granzyme B mRNA in chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 2004;11:130-135
- Wang KX, Peng JL, Wang XF, Tian Y, Wang J, Li CP. Detection of T lymphocyte subsets and mIL-2R on surface of PBMC in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2003;9:2017-2020
- Diepolder HM, Gruener NH, Gerlach JT, Jung MC, Wierenga EA, Pape GR. Different levels of T-cell receptor triggering induce distinct functions in hepatitis B and hepatitis C virus-specific human CD4(+) T-cell clones. *J Virol* 2001;75:7803-7810
- 闫玉萍, 阚晓, 常树珍, 朱彤宇, 郭超英. 慢性乙型肝炎活检组织 HBeAg 含量与肝细胞凋亡率、Apo2.7 因子表达的相关性. 上海免疫学杂志 2003;23:47-49
- 王玉梅, 冯国和, 黄芬, 李颖, 赵桂珍. 肿瘤坏死因子  $\alpha$  及 caspase-3 表达与暴发性肝衰竭细胞凋亡. 中华内科杂志 2003;42:566-570
- Su F, Theodosis CN, Schneider RJ. Role of NF-kappaB and myc proteins in apoptosis induced by hepatitis B virus HBx protein. *J Virol* 2001;75:215-225
- 邢同京, 章廉, 骆抗先, 侯金林, 冯筱榕, 何海棠. 外周血淋巴细胞凋亡在慢性乙型肝炎发病机制中的作用. 世界华人消化杂志 2000;8:232-233
- Kiyici M, Gurel S, Budak F, Dolar E, Gulten M, Nak SG, Memik F. Fas antigen (CD95) expression and apoptosis in hepatocytes of patients with chronic viral hepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:1079-1084
- Ji W, Wang HF, Feng CQ. Activation-induced cell death in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with chronic hepatitis B may be related to abnormal production of interleukin 12 and 10. *J Viral Hepat* 2001;8:30-33
- Hou CS, Wang GQ, Lu SL, Yue B, Li MR, Wang XY, Yu JW. Role of activation-induced cell death in pathogenesis of patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2003;9:2356-2358
- Tsamandas AC, Thomopoulos K, Zolota V, Kourelis T, Karatzas T, Ravazoula P, Tepetes K, Petsas T, Karavias D, Karatza C, Bonikos DS, Gogos C. Potential role of bcl-2 and bax mRNA and protein expression in chronic hepatitis type B and C: a clinicopathologic study. *Mod Pathol* 2003;16:1273-1288
- Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, Ferencik S, Frilling A, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape. *Immunology* 2003;109:487-495
- Kottlil S, Bowmer MI, Trahey J, Howley C, Gamberg J, Grant MD. Fas/FasL-independent activation-induced cell death of T lymphocytes from HIV-infected individuals occurs without DNA fragmentation. *Cell Immunol* 2001;214:1-11
- Simon K, Rotter K, Zalewska M, Gladysz A. HBV-DNA level in blood serum as a predictor of good response to therapy with interferon-alpha-2b of patients with chronic hepatitis B. *Med Sci Monit* 2000;6:971-975
- Rabe C, Cheng B, Caselmann WH. Molecular mechanisms of hepatitis B virus-associated liver cancer. *Dig Dis* 2001;19:279-287
- Tsutsui H, Adachi K, Seki E, Nakanishi K. Cytokine-induced inflammatory liver injuries. *Curr Mol Med* 2003;3:545-559
- 李玲, 顾长海, 李欣. 激活诱导细胞死亡在乙型肝炎发病机制中的意义. 中华医学杂志 2003;83:1146-1149
- Yin XM, Ding WX. Death receptor activation-induced hepatocyte apoptosis and liver injury. *Curr Mol Med* 2003;3:491-508
- 王平忠, 张中伟, 周永兴, 白雪帆. 定量 PCR 检测慢性乙型肝炎患者 HBV-DNA 及其意义. 世界华人消化杂志 2000;8:755-758
- Murakami Y, Minami M, Daimon Y, Okanoue T. Hepatitis B virus DNA in liver, serum, and peripheral blood mononuclear cells after the clearance of serum hepatitis B virus surface antigen. *J Med Virol* 2004;72:203-214
- Zender L, Hutker S, Liedtke C, Tillmann HL, Zender S, Mundt B, Waltemathe M, Gosling T, Flemming P, Malek NP, Trautwein C, Manns MP, Kuhnel F, Kubicka S. Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7797-7802
- Nakamoto Y, Kaneko S. Mechanisms of viral hepatitis induced liver injury. *Curr Mol Med* 2003;3:537-544