

产物为配位完好的同源双链和错配有“凸起”的异源双链。Surveyor 酶可将异源双链从错配部位切开,电泳图呈现 3 条带,1 条为同源双链条带,另外两条为被切断的异源双链,两条链的长度总和等于同源双链的长度。如果异源双链中有多个错配部位,则 Surveyor 酶可有多个作用位点,产生不同长度、不同种类的酶切片段,也会呈现多种带形的电泳图谱。Surveyor 酶法无需大型设备,仅使用普通的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳即可,也可通过琼脂糖电泳判断有无突变的存在。方法简便稳定,便于推广。

(志谢:感谢日本国家结核病研究所菅原勇博士的大力帮助)。

参考文献

- 1 Zager EM and McNeerney R. Multidrug - resistant tuberculosis. BMC Infectious Diseases, 2008, 8(1): 10 - 15
- 2 He GX, Zhao YL, Jiang GL, *et al.* Prevalence of tuberculosis drug resistance in 10 provinces of China. BMC Infectious Diseases, 2008, 8(12): 166 - 174

- 3 Zhang Y and Yew WW. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Int J Tuber Lung Dis, 2009, 13(11): 1320 - 1330
- 4 Cheng AF, Yew WW, Chan EW, *et al.* Multiplex PCR amplicon conformation analysis for rapid detection of gyrA mutations in fluoroquinolone - resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(2): 596 - 601
- 5 Chan RCY, Hui M, Chan EWC, *et al.* Genetic and phenotypic characterization of drug - resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Hong Kong. J Antimicrob Chemotherapy, 2007, 59(5): 866 - 873
- 6 Shi R, Otomo K, Yamada H, *et al.* Temperature - mediated heteroduplex analysis for the detection of drug - resistant gene mutation in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis by denaturing HPLC, SURVEYOR nuclease. Microb Infect, 2006, 8(1): 128 - 135
- 7 Evans JT, Hawkey PM, Smith EG, *et al.* Automated high - throughput mycobacterial interspersed repetitive unit typing of Mycobacterium tuberculosis strains by a combination of PCR and nondenaturing high - performance liquid chromatography. J Clin Microbiol, 2004, 42(9): 4175 - 4180

(收稿: 2010 - 03 - 21)

阿德福韦酯治疗 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎疗效及其与血清 TNF - α 变化的关系

高海兵 林明华 潘 晨 林太杰 郑 玲 原津津 方建凯 周 锐

摘 要 **目的** 分析阿德福韦酯(ADV)治疗 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎(CHB)的疗效及其与血清 TNF - α 水平变化的关系。**方法** 对 203 例 HBeAg 阳性 CHB 患者采用 ADV(名正)10mg/d 治疗 48 周,观察 24 周和 48 周疗效,包括 HBV DNA 转阴、ALT 复常、HBeAg 转阴及血清转换、应答率,并用 ELISA 测定基线及 48 周血清 TNF - α 水平。**结果** 203 例患者 24 周和 48 周 HBV DNA 转阴率、ALT 复常率、HBeAg 转阴率及血清转换率、应答率分别为 31.5%、59.1%、15.8%、8.9%、13.3% 和 58.6%、78.3%、29.6%、16.7%、25.6%。24 周和 48 周 HBV DNA 载量较基线下降的中位值分别是 $3.56\log_{10}$ 拷贝/毫升和 $4.35\log_{10}$ 拷贝/毫升,且 48 周疗效均优于 24 周($P < 0.05$),而除 HBV DNA 未转阴组、ALT 未复常组外,余疗效组 TNF - α 水平在 48 周较基线均下降明显($P < 0.001$)。**结论** HBeAg 阳性 CHB 患者 ADV 治疗 48 周能够有效地抑制 HBV,降低血清 TNF - α 水平。

关键词 肝炎 乙型 慢性 阿德福韦酯 肿瘤坏死因子 α 疗效

Study on Efficacy of Adefovir dipivoxil in HBeAg - positive Chronic Hepatitis B Patients and its Correlation with Serum Levels of Tumor Necrosis Factor α . Gao Haibing, Lin Minghua, Pan Chen, Lin Taijie, Zheng Ling, Yuan Jinjin, Fan Jiankai, Zhou Rui. Department of Hepatology, Fuzhou Municipal Hospital of Infectious Diseases, The Affiliated Infectious Diseases Hospital of Fujian Medical University, Fujian 350025, China

Abstract Objective To investigate the efficacy of Adefovir dipivoxil in HBeAg - positive chronic hepatitis B(CHB) patients and study its correlation with serum levels of tumor necrosis factor α . **Methods** 203 HBeAg - positive CHB patients were recruited into the study and were administered with ADV(Minzen) 10mg once daily for 48 weeks. The efficacy including HBV DNA negativity, alanine ami-

基金项目:福州市社会发展科技项目(2008 - s - 74)

作者单位:350025 福州,福建医科大学附属传染病医院(福州市传染病医院)肝病科

通讯作者:林明华,电子信箱:fulmh@yahoo.com.cn

notransferase (ALT) normalization, HBeAg loss and seroconversion, and response at the treatment times of 24 and 48 weeks were observed. The serum levels of TNF- α at baseline and week 48 were examined by enzyme linked immunosorbent assay. **Results** The rate of HBV DNA negativity, ALT normalization, HBeAg loss and seroconversion, and response in patients at the treatment times of 24 and 48 weeks were 31.5%, 59.1%, 15.8%, 8.9%, 13.3% and 58.6%, 78.3%, 29.6%, 16.7%, 25.6% respectively. And meantime the median reduction in serum HBV DNA loads was $3.56\log_{10}$ and $4.35\log_{10}$ copies/ml respectively. Furthermore the therapeutic effects at week 48 were all considerably better than those at week 24 ($P < 0.05$). There were lower serum levels of TNF- α at week 48 than before treatment in different therapeutic effect groups, which had statistic difference ($P < 0.001$). **Conclusion** ADV can effectively inhibit the copy of HBV, depress serum levels of TNF- α during the treatment times of 48 weeks in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B.

Key words Chronic hepatitis B; Adefovir dipivoxil; Tumor necrosis factor α ; Efficacy

慢性 HBV 感染仍是全球公共卫生问题,目前全世界感染者近 4 亿,每年死于 HBV 相关慢性肝病的超过 50 万^[1]。阿德福韦酯 (adefovir dipivoxil, ADV) 是腺嘌呤磷酸酯化合物阿德福韦的前药,口服后可迅速水解为阿德福韦而发挥抗病毒作用,对 HBV 野生株和拉米夫定耐药变异株均有活性,且耐受性好,不易出现耐药^[2]。慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 是以免疫介导为主的肝脏炎性损伤,肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 作为一种重要的炎症性细胞因子,是宿主的免疫因素之一,在乙型肝炎发病中介导了一系列炎症而引起肝损伤。本文就 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者 ADV 治疗的疗效及其与血清 TNF- α 水平变化的关系做一探讨。

资料与方法

1. 研究对象:选择 2007~2008 年在福州市传染病医院就诊的 HBeAg 阳性 CHB (诊断符合《慢性乙型肝炎防治指南》^[3]) 患者 203 例作为研究对象。(1) 入选标准:HBsAg、HBeAg、HBcAb 阳性持续 6 个月以上且 HBsAb 阴性;年龄 18~60 岁;HBV DNA 载量 $\geq 10^5$ 拷贝/毫升;ALT $\geq 2 \times$ ULN。(2) 排除标准:急性乙型肝炎;肝衰竭;肝硬化;原发性肝癌;合并药物肝、酒精肝病或非酒精性脂肪肝;合并病毒感染 (HAV、HCV、HDV、HEV、CMV、EBV、HIV) 及其他严重疾病 (严重心、肺、肾疾患,精神病,恶性肿瘤,糖尿病等);入选前 3 个月内使用抗病毒药物;入选前 6 个月内或治疗期间接受免疫抑制剂、免疫调节剂治疗;合并自身免疫性肝病,系统性自身免疫性疾病;妊娠患者;血红蛋白 $< 100\text{g/L}$,白细胞计数 $< 3.5 \times 10^9/\text{L}$,血小板 $< 70 \times 10^9/\text{L}$ 。

2. 治疗方案:ADV 为江苏正大天晴药业股份有限公司生产,商品名为名正 (阿德福韦酯胶囊,批号: H20060666),规格为 $10\text{mg} \times 14$ 粒/瓶,用法为 10mg/d 口服,疗程 48 周,治疗期间不使用降酶及免疫调节药物。

3. 观察项目:观察基线、治疗 12、24、36、48 周的肝功能、HBV 血清学标志物、HBV DNA 载量、肾功能、尿常规、血常规。

4. 疗效评价:包括 HBV DNA 转阴、ALT 复常、HBeAg 转阴及血清转换、应答。其中应答指联合应答中完全应答和部分应答,而无应答指未达到完全应答和部分应答^[4]。

5. 安全性评价:观察 ADV 不良反应并进行登记,对出现严重不良反应的及时反馈信息,并予以相应处理。

6. 实验方法:(1) 生化指标及血清标志物检测:肝功能采用美国 Beckman CX9 ALX 型全自动生化分析仪及其配套试剂检测,HBV 血清标志物定性采用 ELISA 检测 (试剂盒为厦门晶美生物工程公司产品),HBV-DNA 载量采用实时荧光定量 PCR 检测 (试剂盒为深圳匹基生物公司产品,检测下限为 500 拷贝/毫升)。所有检测均严格按照试剂盒说明书进行操作。(2) 血清 TNF- α 水平的检测:采用奥地利 anthos 公司的 anthos2010 酶标仪进行 ELISA 测定基线及治疗 48 周血清 TNF- α 水平。操作方法按武汉博士德生物工程有限公司的人 TNF- α ELISA 试剂盒说明书。

7. 统计学方法:用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。不同疗程同一疗效的比较采用 χ^2 检验,同一疗效治疗前后 TNF- α 水平的比较采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 研究对象临床情况:203 例患者中,男性占 71.4% (145/203),女性占 28.6% (58/203),平均年龄 31.5 ± 9.6 岁,平均 BMI $21.4 \pm 2.3\text{kg/m}^2$,基线平均 ALT $208.5 \pm 156.1\text{U/L}$ 、HBV DNA 载量 $7.57 \pm 0.94\log_{10}$ 拷贝/毫升、TNF- α 水平为 $213.5 \pm 35.3\text{pg/ml}$,48 周 TNF- α 水平为 $191.3 \pm 26.5\text{pg/ml}$ 。

2. 安全性评价:治疗 48 周内未发现患者出现血清肌酐的异常升高及过敏等不良事件发生。

3. 不同疗程的疗效及比较:24 周 HBV DNA 转阴率、ALT 复常率、HBeAg 转阴率及转换率、应答率分别为 31.5%、59.1%、15.8%、8.9%、13.3%,48 周 HBV DNA 转阴率、ALT 复常率、HBeAg 转阴率及转换率、应答率分别为 58.6%、78.3%、29.6%、16.7%、25.6%,24 周和 48 周 HBV DNA 载量较基线下降的中位值分别是 $3.56\log_{10}$ 拷贝/毫升和 $4.35\log_{10}$ 拷贝/毫升。比较疗程 24 周和 48 周的疗效发现,48 周时 HBV DNA 转阴率、ALT 复常率、HBeAg 转阴率、HBeAg 转换率、应答率均优于 24 周,两者差异具有统计学意义 (表 1)。

表 1 ADV 疗程 24 周和 48 周的疗效比较

疗效 (n = 203)	疗程		χ^2	P
	24 周	48 周		
HBV DNA 转阴率 (%)	31.5	58.6	30.095	0.000
ALT 复常率 (%)	59.1	78.3	17.428	0.000
HBeAg 转阴率 (%)	15.8	29.6	11.019	0.001
HBeAg 转换率 (%)	8.9	16.7	5.646	0.017
应答率 (%)	13.3	25.6	9.823	0.002

4. 血清 TNF - α 水平的变化: 比较不同疗效组 ADV 治疗前后血清 TNF - α 水平的变化, 发现 48 周时所有研究对象、HBV DNA 转阴组、ALT 复常组、HBeAg 转阴组及未转阴组、HBeAg 转换组及未转换组、应答组及无应答组较基线血清 TNF - α 水平下降明显, 均有统计学意义, 而 HBV DNA 未转阴组、ALT 未复常组的 TNF - α 水平变化无统计学意义 (表 2)。

表 2 48 周时不同疗效组 ADV 治疗前后血清 TNF - α 水平的比较

组别 (48 周疗效)	n	TNF - α (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)		t	P
		基线	48 周		
所有研究对象	203	213.5 $\pm$ 35.3	191.3 $\pm$ 26.5	8.644	0.000
HBV DNA 转阴组	119	217.9 $\pm$ 37.9	183.0 $\pm$ 19.8	9.446	0.000
HBV DNA 未转阴组	84	207.3 $\pm$ 30.3	203.1 $\pm$ 30.2	1.95	0.055
ALT 复常组	159	216.3 $\pm$ 36.0	189.2 $\pm$ 26.2	8.791	0.000
ALT 未复常组	44	203.6 $\pm$ 31.0	199.0 $\pm$ 26.5	1.644	0.108
HBeAg 转阴组	60	231.5 $\pm$ 37.9	184.0 $\pm$ 24.3	8.798	0.000
HBeAg 未转阴组	143	205.9 $\pm$ 31.3	194.4 $\pm$ 26.9	4.917	0.000
HBeAg 转换组	34	230.2 $\pm$ 36.5	181.5 $\pm$ 16.1	6.726	0.000
HBeAg 未转换组	169	210.1 $\pm$ 34.2	193.3 $\pm$ 27.8	6.645	0.000
应答组	52	234.8 $\pm$ 37.5	182.1 $\pm$ 22.5	8.988	0.000
无应答组	151	206.2 $\pm$ 31.4	194.5 $\pm$ 27.1	5.208	0.000

讨 论

ADV 是继拉米夫定之后的一种核苷酸类抗病毒药物, 对 HBV 野生株和拉米夫定耐药变异株均有活性。Marcellin 等^[4]进行的一项多中心、随机、安慰剂对照研究, 有 515 例 HBeAg 阳性 CHB 患者进入研究, 每日分别给予 ADV 10mg、30mg 和安慰剂治疗 48 周。结果显示, ADV 10mg、30mg 组和安慰剂组的血清 HBV DNA 水平下降的中位值分别为 3.52、4.76、0.55log₁₀ 拷贝/毫升, ALT 复常率分别为 48%、55%、16%, 血清 HBeAg 转换率分别为 12%、14%、6%, 肝组织学改善率分别为 53%、59%、25%, 与安慰剂组相比均有统计学差异, 而 ADV 10mg 组与安慰剂组的安全性相似, 且所有患者在治疗期间未发现与 ADV 相关的 HBV DNA 聚合酶基因变异, 但每日 30mg 组则有较多的不良事件和肾功能参数异常。本研究用 ADV 10mg/d 对 203 例 HBeAg 阳性 CHB 患者治疗 48 周, 其 24 周 HBV DNA 转阴率、ALT 复常率、HBeAg 转阴率及转换率、应答率分别为 31.5%、59.1%、15.8%、8.9%、13.3%, 48 周 HBV DNA 转阴率、ALT 复常率、HBeAg 转阴率及转换率、应答率分别为 58.6%、78.3%、29.6%、16.7%、25.6%, 24 周和 48

周 HBV DNA 载量较基线下降的中位值分别是 3.56、4.35log₁₀ 拷贝/毫升, 也提示 ADV 对 HBeAg 阳性 CHB 患者有明显地抑制 HBV DNA 作用, 其 48 周疗效与国内欧强等报道的 ADV 治疗 HBeAg 阳性 CHB 患者疗效相似^[4,5]。本研究还显示 48 周 HBV DNA 转阴率、ALT 复常率、HBeAg 转阴率及转换率、应答率均优于 24 周, 两者差异具有统计学意义, 提示持续 ADV 治疗 48 周可提高疗效。

TNF - α 可通过非细胞溶解性途径抑制和清除 HBV, 且对 HBV 特异性 CTL 增生及协同其他细胞因子清除 HBV 也都是必须的^[6-8]。由于考虑 ADV 起效较慢, 本研究仅探讨了 48 周不同疗效组 ADV 治疗前后血清 TNF - α 水平的变化, 发现所有研究对象、HBV DNA 转阴组、ALT 复常组、HBeAg 转阴组及未转阴组、HBeAg 转换组及未转换组、应答组及无应答组在治疗 48 周后血清 TNF - α 水平下降明显, 均有统计学意义, 而 HBV DNA 未转阴组、ALT 未复常组的 TNF - α 水平变化无统计学意义, 提示 ADV 能够减轻肝脏炎症, 促进肝功能恢复, 而 HBV DNA 未转阴或 ALT 未复常者, 仍可能存在较明显的肝脏免疫损伤, 这也说明最大限度地长期抑制或消除 HBV 的

重要性^[3]。但这与 Renate 等^[9]发现 ADV 治疗 3~6 个月后随着病毒量的下降,出现髓样树突状细胞的数量升高及其功能的恢复而伴随 IL-12 及 TNF- α 水平升高的结论似乎有矛盾,笔者推测 ADV 治疗 3~6 个月后随着病毒量的下降,机体的免疫功能有所恢复,此时 TNF- α 等相关细胞因子水平升高,有助于进一步抑制和清除 HBV,而到 48 周后 HBV 已大量被抑制和清除,肝脏免疫损伤减轻, TNF- α 水平下降。

参考文献

- 1 Maddrey WC. Hepatitis B: an important public health issue. *J Med Virol*, 2000, 61(3): 362-366
- 2 Tillmann HL. Antiviral therapy and resistance with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(1): 125-140
- 3 中华医学会肝病学分会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13(12): 881-891
- 4 Marcellin P, Chang TT, Lim SG, et al. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N Engl J*

Med, 2003, 348(9): 808-816

- 5 欧强, 诸思贻, 殷科珊. 阿德福韦酯治疗 e 抗原阳性慢性乙型肝炎患者疗效和安全性观察. *肝脏*, 2007(5), 12: 423-424
- 6 Puro R, Schneider RJ. Tumor necrosis factor activates a conserved innate antiviral response to hepatitis B virus that destabilizes nucleocapsids and reduces nuclear viral DNA. *J Virol*, 2007, 81(14): 7351-7362
- 7 Kasahara S, Ando K, Saito K, et al. Lack of tumor necrosis factor- α induces impaired proliferation of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Virol*, 2003, 77(4): 2469-2476
- 8 Paschetto V, Wieland SF, Uprichard SL, et al. Cytokine-sensitive replication of hepatitis B virus in immortalized mouse hepatocyte cultures. *J Virol*, 2002, 76(11): 5646-5653
- 9 Renate G, van der Molen, Dave Sprengers, et al. Favorable effect of adefovir on the number and functionality of myeloid dendritic cells of patients with chronic HBV. *Hepatology*, 2006, 44(4): 907-914

(收稿: 2010-04-22)

白细胞介素-18 在类风湿关节炎患者血清中的表达及临床分析

任 敏 武加标 肖 菁 汤 丽 蒋立新

摘 要 **目的** 研究白细胞介素 18(interleukin-18, IL-18)在类风湿关节炎(RA)患者血清中的表达水平,并进一步探讨它们与临床指标的关系。**方法** 将 63 例 RA 患者组分为抗 CCP 阳性组和阴性组,应用 ELISA 方法检测 63 例患者和 27 例对照组的 IL-18 表达水平。**结果** IL-18 在 RA 抗 CCP 阳性组、阴性组和对照组依次为 213.27 ± 49.60 pg/ml、 192.03 ± 32.88 pg/ml 和 185.42 ± 44.93 pg/ml,抗 CCP 阳性组的表达水平高于抗 CCP 阴性组和对照组,其差异有统计学意义($P < 0.01$)。RA 抗 CCP 阳性组患者 IL-18 水平与 DAS28 呈负相关($r = -0.28, P < 0.05$),与外周血 WBC 计数呈负相关性($r = -0.51, P < 0.05$),而与 ESR、CRP 无相关性($P > 0.05$)。RA 抗 CCP 阴性组患者 IL-18 水平与 DAS28 呈负相关($P < 0.05$)。**结论** IL-18 水平在 RA 患者表达升高,IL-18 水平与 DAS28 呈负相关推测 IL-18 可能参与了 RA 的发病过程。

关键词 类风湿关节炎 细胞因子 白介素-18

Expression and Clinical Significance of IL-18 in Rheumatoid Arthritis Patients. Ren Min, Wu Jiabiao, Xiao Jing, Tang Li, Jiang Lixin. *Department of Rheumatology, Wujin Hospital, Jiangsu University, Jiangsu 213002, China*

Abstract Objective To investigate the expression of sera interleukin-18 (IL-18), and analyze its clinical significance. **Methods** 63 rheumatoid arthritis(RA) patients were divided into two groups according to anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibodies, and 27 normal subjects were enrolled as control group. Levels of IL-18 in the serum were analysed by ELISA. **Results** In anti-CCP antibodies positive patients, IL-18 serum levels were enhanced compared with two other groups and the levels of expression were 213.27 ± 49.60 pg/ml, 192.03 ± 32.88 pg/ml and 185.42 ± 44.93 pg/ml, respectively among the three groups, and this changes were sig-

基金项目:常州市科技发展技术项目[2009(90)cs20092002]

作者单位:213002 常州,江苏大学附属医院风湿免疫科(任敏、武加标、汤丽、肖菁),检验科(蒋立新)

通讯作者:任敏,电子信箱:minren2007@yahoo.com.cn