

· 论 著 ·

# 蛋白激酶信号级联 Akt 在大鼠脊髓损伤后的诱导表达\*

胡凌云<sup>1</sup>, 张建英<sup>2</sup>, 苟林<sup>1</sup>, 刘康<sup>3</sup>, 林涛<sup>1</sup>, 冯刚<sup>3</sup>

(1. 川北医学院附属第二临床医学院/四川省南充市中心医院骨科 637000; 2. 川北医学院附属第二临床医学院/四川省南充市中心医院影像中心 637000; 3. 川北医学院组织工程与干细胞研究所, 四川南充 637000)

**摘要:**目的 研究蛋白激酶信号级联蛋白激酶 B(Akt)在大鼠脊髓损伤(SCI)后的表达变化,以及对 SCI 后运动功能恢复的影响,从而为 SCI 的修复提供分子学机制依据。方法 采用改良 Allen's 打击器制成大鼠 SCI 模型。大鼠分为 3 组:假手术组(Sham 组)、干预组(Int 组)、对照组(Con 组)。分别于术后 1、7、14 d 采用免疫组织化学、蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 Akt mRNA 和蛋白的表达,并采用 Basso-Beattie-Bresnahan(BBB)运动功能评分评价大鼠 SCI 后运动恢复情况。结果 Sham 组在 Akt 蛋白和 mRNA 水平上呈低水平表达,SCI 后 Akt 的表达水平明显提高;Akt 上游磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)的抑制剂 LY294002 可明显抑制 Akt 的表达,并阻止 SCI 后自发性运动功能恢复。结论 SCI 后激活的蛋白激酶信号 Akt 可能是参与 SCI 后神经保护和修复的重要干预环节。

**关键词:**脊髓损伤;蛋白激酶信号级联;蛋白激酶 B

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.06.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)06-0644-04

## Induced expression of protein kinase signaling cascade Akt after spinal cord injury in rats\*

Hu Lingyun<sup>1</sup>, Zhang Jianying<sup>2</sup>, Gou Lin<sup>1</sup>, Liu Kang<sup>3</sup>, Lin Tao<sup>1</sup>, Feng Gang<sup>3</sup>

(1. Second Clinical Medical College, North Sichuan Medical College/Department of Orthopaedics, Nanchong Central Hospital, Nanchong, Sichuan 637000, China; 2. Second Clinical Medical College, North Sichuan Medical College/Department of Radiology, Nanchong Central Hospital, Nanchong, Sichuan 637000, China; 3. Institute of Tissue Engineering and Stem Cells, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

**Abstract:** Objective To examine the expression of protein kinase signaling cascade protein kinase B(Akt)-which plays an important role in a number of key biological functions in cellular processes after spinal cord injury (SCI) in rats, and its effects on SCI induced motor function defects, and to provide the molecular mechanism for repairing SCI. Methods SCI was produced by extradural contusion using modified Allen's stall with damage energy. The rats were divided into three groups: sham-operated group (Sham), interference group (Int), and control group (Con). Using immunostaining studies, Western blot analyses and real-time qualitative RT-PCR analyses, we detected the changes of Akt expression at the protein and mRNA level in spinal cord tissues at 1, 7, and 14 d after surgery, and evaluated the presence and extent of neurological impairment after SCI by the BBB locomotor rating scale. Results The sham operated groups exhibited low expression of the Akt signaling at the protein and mRNA level, and the expressions increased following SCI. Compared to the animals in the sham operated groups, prominently elevated level of Akt signaling was detected in the injured spinal cords of SCI group. LY294002, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) that initiates Akt phosphorylation, prominently inhibited the expression of Akt produced by SCI and the spontaneous recovery of motor function after SCI. Conclusion Activated protein kinase signaling cascade Akt might be the important intervention aspects of involving in neuroprotective and repair process after SCI.

**Key words:** spiral injuries; protein kinase signaling cascades; protein kinase B

作为在细胞外信号、生长因子、细胞能量状态和应急等条件下参与细胞生长、增殖、存活和分化的一个主要控制器,蛋白激酶 B(Akt)在很多关键细胞生物学功能中起重要作用<sup>[1]</sup>。Akt 最近在神经科学领域受到了极大的关注,有报道称 Akt 或磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/Akt 通路参与神经元的发育与分化、抑制神经凋亡、促进轴突生长以及介导突触的可塑性等众多细胞过程,在神经生理及病理过程中起重要作用<sup>[2-4]</sup>。但对 Akt 在脊髓损伤(SCI)后的表达状况及神经生理、病理机制还知之甚少。本实验分析蛋白激酶信号 Akt 在大鼠 SCI 后的表

达变化及对 SCI 后运动功能恢复的影响,从而为 SCI 后神经保护和修复过程提供可能的分子学机制依据,现报道如下。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 54 只成年健康雌性 SD 大鼠,体质量 250~300 g (川北医学院实验动物中心提供)。兔多克隆抗体 Akt、磷酸化的 Akt(p-Akt)(Ser473)、LY294002(Cell Signaling Technology 公司,USA);聚偏氟乙烯(PVDF)膜、蛋白免疫印迹法(Western blot)检测试剂 AB 液(Millipore 公司,USA);小鼠多克隆抗体  $\beta$ -actin(北京中杉金桥生物技术公司);BCA 蛋白定量测

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81100929)。 作者简介:胡凌云(1983—),主治医师,硕士,主要从事脊髓损伤的生物修复与功能重建的研究。

试剂盒(北京博奥森生物技术公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗、SABC 免疫组织化学试剂盒和 DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物技术公司);PrimeScript RT 试剂盒、SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒、Trizol(Takara,大连宝生物公司);引物(Invitrogen Biotechnology 公司,USA)。DP71 光学显微镜(Olympus, Japan);ABI Prism 7300 System(Applied Biosystems, USA);Image-Pro PLUS 图像分析软件(Meyer Instruments 公司, USA)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 SCI 模型制备 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉,常规备皮消毒。取后正中切口约 5 cm 逐层切开,分离肌肉,暴露椎骨,去除 T<sub>8-10</sub> 棘突及相应椎板,在 T<sub>8-10</sub> 平面打开椎管,充分暴露脊髓背面及两侧。采用改良 Allen's 打击器(4 g×12.5 cm)造成 T<sub>8-10</sub> 节段脊髓损伤(36 只),以动物身体抖动、双后肢回缩样扑动、鼠尾痉挛性摆动并下垂、双下肢软瘫为打击成功标志,缝合肌肉和皮肤。在 1~2 周的生存期中,对 SCI 大鼠每天排空膀胱 2 次直至恢复正常的膀胱功能。对另外 18 只大鼠施行假手术,即仅行椎板切除术而不造成 SCI。

1.2.2 动物分组、运动功能测试及组织样品准备 54 只分为 3 组:假手术组(Sham 组),生理盐水(40 mg/kg)经腹腔注射后仅行椎板切除术(18 只);干预组(Int 组),等量生理盐水联合 LY294002(100 mg/kg)<sup>[5]</sup> 经腹腔注射后造成 SCI 模型(18 只);对照组(Con 组),等量生理盐水经腹腔注射后造成 SCI 模型(18 只)。分别于术后 1、7、14 d,对每组大鼠根据 Basso-Battie-Bresnahan(BBB)运动评分法评估后肢运动情况后处死,以损伤为中心快速取出由 3 个受损脊髓节段组成的约 1.5 cm 长的组织块。将所取组织块横断成两等分,把头侧的脊髓节段固定在 4%多聚甲醛中,4℃过夜,进一步作免疫组织化学研究;把尾侧的脊髓节段矢状切成两等分,并保存在液氮中,分别作蛋白质以及 mRNA 检测。

1.2.3 免疫组织化学检测 固定后,石蜡包埋,然后以损伤为中心切成一系列连续的 5 μm 厚的旁矢状面切片,置于附有多聚赖氨酸的载玻片上。常规脱蜡至水后,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 10 min,蒸馏水洗后放入 10 mmol/L 枸橼酸盐(pH 6.0)中进行微波抗原修复。冷却磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后,5%牛血清蛋白(BSA)室温封闭 1 h,使用一抗 Akt(1:400)作免疫组织化学染色,4℃孵育过夜。PBS 洗 3 次(5 次/分钟)后,滴加生物素化羊抗兔/鼠二抗,室温孵育 30 min, PBS 洗 3 次后,滴加 ABC 试剂室温孵育 30 min,经 PBS 洗涤后用二氨基联苯胺(DAB)显色、复染、脱水、封片。Olympus 光学显微镜下观察并拍照。阴性对照用 PBS 代替一抗。

1.2.4 Western blot 检测 采用细胞组织快速裂解液(RIPA)缓冲液,加入蛋白酶和磷酸酶抑制剂裂解脊髓组织,裂解液在 4℃离心 15 min(12 000 r/min),收集上清液并用 BSA 定量测试盒检测总蛋白浓度。每孔 8 μg 的总蛋白样品浓度为 5%~17% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,转入 PVDF 膜(0.45 μm),将膜用 2%的封闭蛋白干粉室温封闭 2 h 后,用一抗 Akt、p-Akt(Ser473)(1:1 000) 4℃孵育过夜,经 PBS 洗 3 次后用 HRP 标记的二抗(1:5 000) 37℃孵育 2 h。经 PBS 充分漂洗后,目的蛋白由增强化学发光法检测并曝光于 X 线上。对 Akt 的 Western blot 定量分析采用相对光密度法,表达为每条带的累积光密度比相应的 β-actin。

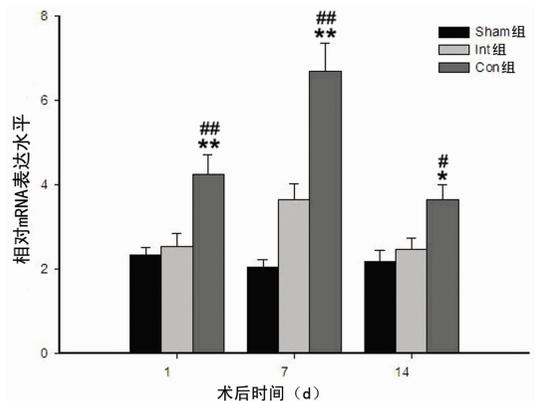
1.2.5 实时荧光定量-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 Trizol 试剂提取总 RNA 后,用 PrimeScript RT 试剂盒在 10 μL 反应

体系(5×PrimeScript™ 缓冲液 2 μL, PrimeScript™ RT Enzyme Mix I 0.5 μL, Oligo dT Primer 0.5 μL, Random 6 mers 0.5 μL,总 RNA+Rnase Free dH<sub>2</sub>O 6.5 μL)中合成 cDNA。每 4 μL 的 cDNA 模板在含有 25 μL 的 SYBR Premix Ex Taq II 和 2 μL 引物的 50 μL 反应体系中进行扩增。RT-PCR 采用 ABI Prism 7300 System 在如下条件下执行:95℃预变性 10 s;95℃变性 5 s,60℃退火延伸 31 s,循环 40 次。Invitrogen Biotechnology 公司合成的 Akt 目的基因引物序列为:5'-TCA CCT CTG AGA CCG ACA CC-3'(上游),5'-ACT GGC TGA GTA GGA GAA CTG G-3'(下游)。mRNA 的相对表达水平表示为每个 mRNA 的平均定量值与相应看家基因 GAPDH 的平均值的比值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较行单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

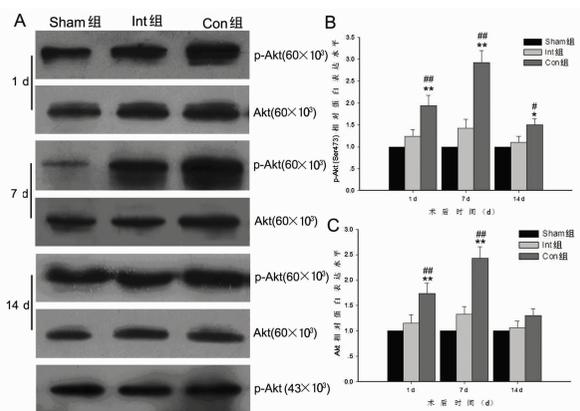
2 结果

2.1 RT-PCR 分析结果 Sham 组中的 Akt mRNA 在整个实验过程中均呈低水平稳定表达。在 SCI 后的头 1 周内,Con 组的 Akt mRNA 表达明显高于 Sham 组,在第 7 天达高峰,而 PI3K 抑制剂 LY294002 抑制了 SCI 所诱导的 Akt mRNA 表达。之后,Con 组的表达水平随时间延长逐渐下降,到第 14 天以后基本回落至其他两组的水平,见图 1。



\*: P<0.05, \*\*: P<0.01, 与 Sham 组比较; #: P<0.05, #: P<0.01, 与 Int 组比较。

图 1 RT-PCR 检测 SCI 后 Akt mRNA 表达水平



A:p-Akt, Akt 蛋白 Western blot 分析图;B:p-Akt 蛋白 Western blot 分析图;C: Akt 蛋白 Western blot 分析图。\*: P<0.05, \*\*: P<0.01, 与 Sham 组比较; #: P<0.05, #: P<0.01, 与 Int 组比较。

图 2 Western blot 检测 SCI 后 Akt、p-Akt 蛋白表达水平

2.2 Western blot 检测 Con 组 Akt 蛋白表达在 SCI 后 1、7 d

明显高于 Sham 组与 Int 组,在术后第 7 天达到高峰,以后随着时间延长逐渐下降至接近另外两组的水平(图 2A、C)。为进一步证实蛋白激酶 Akt 是否在 SCI 后被激活,检测了 p-Akt。Con 组的 p-Akt(Ser473)表达在 SCI 后 1、7、14 d 明显高于 Sham 组,LY294002 则显著抑制了 SCI 后所诱导的 Akt 活化,见图 2。

**2.3 免疫组织化学分析** Con 组 Akt 在术后第 1、7 天的阳性表达明显强于 Sham 组和 Int 组。增强表达的 Akt 主要位于受损脊髓周围的神经元细胞质内,见图 3。

**2.4 BBB 功能测试** Con 组的 BBB 评分在整个过程中逐渐升高,而 LY294002 则明显阻碍了 BBB 评分升高的水平,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 4。

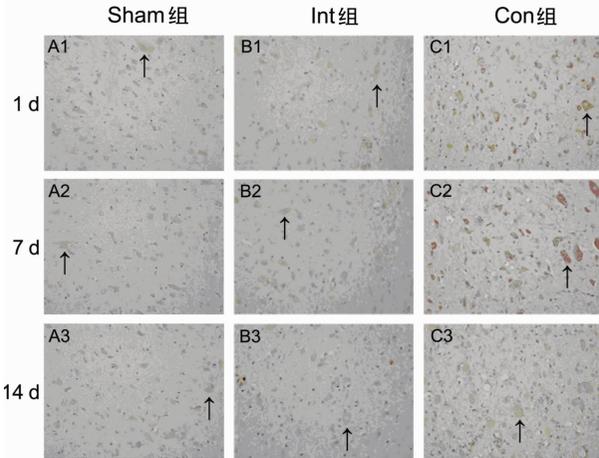


图 3 大鼠脊髓免疫组织化学检测( $\times 200$ )

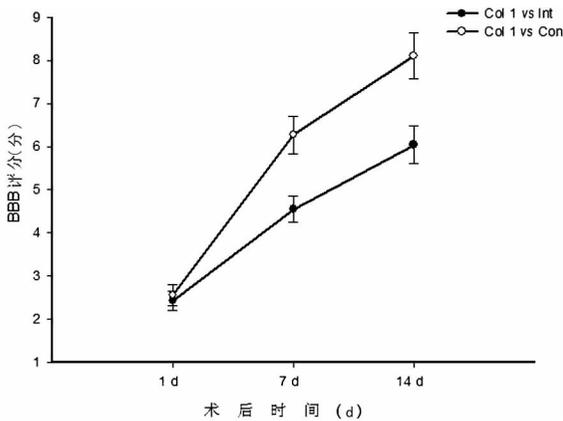


图 4 BBB 运动功能评分

### 3 讨论

传统认为成体中枢神经系统(CNS)处于静止状态、缺乏再生和重组能力、在损伤后不能再生或修复的观点目前已受到诸多挑战,比如在 SCI 后产生的自发性神经功能恢复、自发性神经轴突芽生与轴突联系的重组以及自发性神经元形成均表明 CNS 并非处于完全静止,无疑令 SCI 的治疗前景更加广阔<sup>[6]</sup>。但是产生这些自发性修复的分子机制仍不很清楚,且这种自我修复的能力非常有限,因此如何发现并控制这些关键的分子信号以引领利于 SCI 修复的方向发展,无疑对 SCI 的治疗具有里程碑式的意义。

细胞外信号激活蛋白激酶级联,导致一些可调节与细胞生长和凋亡有关基因表达的转录因子的诱导与激活,借此影响细胞与组织损伤后的修复与可塑性。一些蛋白激酶在损伤后的持久激活特性为治疗机体损伤提供了一个重要的时间窗<sup>[7]</sup>。

伴随对蛋白激酶信号在机体生理条件下所起作用了解的深入,他们在很多疾病发病机制以及病理中的作用受到越来越多的关注。蛋白激酶信号已在 CNS 损伤包括 SCI 的治疗中引起了研究者极大兴趣。

Akt 是所有高等真核生物细胞的一个关键信号枢纽,在人体生理和病理的核心过程中,它是最重要、最万能的蛋白激酶之一<sup>[1]</sup>。本实验证实,在大鼠 SCI 后 Akt 信号的表达显著增强,其与先前的体外<sup>[8]</sup>及体内<sup>[9-10]</sup>相关研究结果相符合。Namikawa 等<sup>[8]</sup>发现在舌下神经轴突切断术后 Akt 的表达水平显著增高,Noshita 等<sup>[9]</sup>及 Shioda 等<sup>[10]</sup>发现在小鼠的创伤性脑损伤和缺血性脑损伤后,Akt 或 PI3K/Akt 通路的表达水平亦是显著增高的。并且笔者证实在 SCI 后运动功能的恢复依赖于 Akt,但其增高的 Akt 表达在 SCI 的病理与修复中到底发挥怎样的作用,目前还不得而知。基于已有的相关研究,笔者认为 Akt 或 PI3K/Akt 信号可能具备如下的作用与潜能:抗神经元凋亡的作用、促进脊髓内源性神经前体细胞(NPCs)增殖并向神经元分化的作用、促进神经轴突再生的作用以及介导突触的可塑性等作用。

Akt 作为一个细胞生存信号的介质,可以受生长因子和离子电流的刺激而被激活<sup>[8]</sup>。Akt 或 PI3K/Akt 信号被认为是调节神经元生存的中枢性控制因子,与神经元的存活密切相关<sup>[3,11]</sup>。营养因子如神经生长因子(NGF)、胰岛素样生长因子(IGF-I)与脑源性神经营养因子(BDNF)等可以通过激活 Akt 而介导或促进神经细胞的存活<sup>[3]</sup>。Namikawa 等<sup>[8]</sup>和 Kretz 等<sup>[12]</sup>证实啮齿动物视神经和舌下神经损伤后,Akt 表达的增加具有抗神经元凋亡的作用。在老鼠创伤性脑损伤以及缺血性脑损伤后,其神经元中的 Akt 活性显著增强,抑制神经元凋亡、起神经保护作用<sup>[9-10]</sup>。通常认为 Akt 或 PI3K/Akt 通路是通过磷酸化抑制促凋亡分子 BAD、GSK-3、FKHR 和 caspase 等而发挥其抗凋亡作用的<sup>[3,8-10]</sup>。

通常将 CNS 损伤后发生的自发性神经形成归因于存在于 CNS 的内源性 NPCs 增殖与分化<sup>[6]</sup>。因此,如何增加 NPCs 的增殖及向神经元系分化无疑对 SCI 的修复非常关键。Akt 与神经元的发育与分化有关。有研究报道,PI3K/Akt 通路可以通过激活蛋白质依赖合成的效应因子而参与神经元树突和棘突的形成,从而在神经元的发育过程中起重要作用<sup>[2]</sup>。体外已证实激活 Akt 促进 NPCs 向神经元方向分化,在体外促进神经形成<sup>[13]</sup>,并且体内已发现 PI3K/Akt 通路可以增强大脑缺血诱导的神经形成,在改善缺血损伤后的记忆和认知功能上起着重要作用<sup>[14]</sup>。

研究表明,轴突的导向性生长依赖于蛋白质的合成<sup>[15]</sup>。Akt 可以通过激活蛋白质合成的途径促进轴突的再生,在啮齿动物视神经和舌下神经损伤后具有抗神经元凋亡与促进轴突再生的双重作用<sup>[8,12]</sup>。上调 Akt/mTOR 信号可增强皮质神经元<sup>[16]</sup>及小脑颗粒神经元<sup>[17]</sup>的轴突生长。Akt 可通过 mTOR/p70S6K 通路调节 CNS 的髓鞘形成<sup>[18]</sup>。最近的研究证实,启动并激活此通路可通过持续合成轴突相关蛋白而诱导轴突离断的视神经节细胞和背根神经节细胞广泛的轴突再生<sup>[15,19]</sup>。

本研究发现,SCI 后蛋白激酶 Akt 被激活,并且 SCI 后运动恢复依赖于 Akt,激活的 Akt 信号可在 SCI 后抑制神经元的凋亡、诱导新神经元的产生、促进轴突的生长等方面发挥重要作用,从而有利于促进 SCI 修复及神经功能改善。但是鉴于体内蛋白激酶信号级联的复杂性,Akt 或 PI3K/Akt 信号通路发挥相应作用的机制以及所产生的这些具体生物效应尚需进一

步研究。

#### 参考文献:

- [1] Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream[J]. *Cell*, 2007, 129(7): 1261-1274.
- [2] Jaworski J, Spangler S, Seeburg DP, et al. Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway[J]. *J Neurosci*, 2005, 25(49): 11300-11312.
- [3] Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2001, 11(3): 297-305.
- [4] Horwood JM, Dufour F, Laroche S, et al. Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat[J]. *Eur J Neurosci*, 2006, 23(12): 3375-3384.
- [5] Roviezzo F, Cuzzocrea S, Di Lorenzo A, et al. Protective role of PI3-kinase-Akt-eNOS signalling pathway in intestinal injury associated with splanchnic artery occlusion shock[J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 151(3): 377-383.
- [6] Bareyre FM. Neuronal repair and replacement in spinal cord injury[J]. *J Neurol Sci*, 2008, 265(1/2): 63-72.
- [7] Neary JT. Protein kinase signaling cascades in CNS trauma[J]. *IUBMB Life*, 2005, 57(11): 711-718.
- [8] Namikawa K, Honma M, Abe K, et al. Akt/protein kinase B prevents injury-induced motoneuron death and accelerates axonal regeneration[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(8): 2875-2886.
- [9] Noshita N, Lewen A, Sugawara T, et al. Akt phosphorylation and neuronal survival after traumatic brain injury in mice[J]. *Neurobiol Dis*, 2002, 9(3): 294-304.
- [10] Shioda N, Ishigami T, Han F, et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway by a vanadyl compound mediates its neuroprotective effect in mouse brain ischemia[J]. *Neuroscience*, 2007, 148(1): 221-229.
- [11] May V, Lutz E, MacKenzie C, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide(PACAP)/PAC1HOP1 receptor activation coordinates multiple neurotrophic signaling pathways: Akt activation through phosphatidylinositol 3-kinase gamma and vesicle endocytosis for neuronal survival[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(13): 9749-9761.
- [12] Kretz A, Happold CJ, Marticke JK, et al. Erythropoietin promotes regeneration of adult CNS neurons via Jak2/Stat3 and PI3K/AKT pathway activation[J]. *Molecular Cell Neurosci*, 2005, 29(4): 569-579.
- [13] Bai Y, Cui M, Meng Z, et al. Ectopic expression of angiotensin-1 promotes neuronal differentiation in neural progenitor cells through the Akt pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 378(2): 296-301.
- [14] Shioda N, Han F, Morioka M, et al. Bis(1-oxy-2-pyridine-thiolato) oxovanadium (IV) enhances neurogenesis via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and extracellular signal regulated kinase activation in the hippocampal subgranular zone after mouse focal cerebral ischemia[J]. *Neuroscience*, 2008, 155(3): 876-887.
- [15] Verma P, Chierzi S, Codd AM, et al. Axonal protein synthesis and degradation are necessary for efficient growth cone regeneration[J]. *J Neurosci*, 2005, 25(2): 331-342.
- [16] Jin Y, Sui HJ, Dong Y, et al. Atorvastatin enhances neurite outgrowth in cortical neurons in vitro via up-regulating the Akt/mTOR and Akt/GSK-3beta signaling pathways[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(7): 861-872.
- [17] Okada K, Tanaka H, Temporin K, et al. Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway regulates neurite outgrowth in cerebellar granule neurons stimulated by methylcobalamin[J]. *Neurosci Lett*, 2011, 495(3): 201-204.
- [18] Narayanan SP, Flores AI, Wang F, et al. Akt signals through the mammalian target of rapamycin pathway to regulate CNS myelination[J]. *J Neurosci*, 2009, 29(21): 6860-6870.
- [19] Park KK, Liu K, Hu Y, et al. Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway[J]. *Science*, 2008, 322(5903): 963-966.

(收稿日期:2013-08-28 修回日期:2013-11-22)

(上接第 643 页)

- 2008, S1(2): 12-18.
- [10] Mondelli MU, Varehetta S, Oliviero B. Natural killer cells in viral hepatitis: facts and controversies[J]. *Eur J Clin Invest*, 2010, 40(9): 851-863.
- [11] 杨宏志, 边壮, 王拥泽, 等. 慢性乙型肝炎虚实病机与病毒复制及 T 细胞关系的研究[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2003, 10(3): 158-160.
- [12] 高媛, 许晓东. 慢性乙型肝炎免疫状态与辨证分型的关系[J]. *北京中医药大学学报*, 2002, 25(1): 71-72.
- [13] 唐翔宇, 杨丽莎, 唐美媛, 等. 广西桂北地区慢性 HBV 感染不同免疫状态与外周血 T、B 细胞亚群和 NK 细胞的相关性研究[J]. *重庆医学*, 2013, 42(5): 496-498.
- [14] 吴晓枫, 秦浩歌, 辛晓丽, 等. 慢性乙型肝炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群变化[J]. *中国热带医学*, 2008, 8(4): 525-526, 531.
- [15] 朱培芳, 周永列, 王伯昌. HBeAb 及 HBcAg 均阳性的慢性乙型肝炎患者外周血 NK 细胞数的研究[J]. *江西医学检验*, 2001, 19(2): 68-70.

(收稿日期:2013-09-23 修回日期:2013-12-27)