

## • 基础实验研究论著 •

# MET4 和 C-28 抗体检测卵巢上皮性肿瘤组织中 MET 蛋白表达的对比研究

郭振英<sup>1</sup>, 黄嫣<sup>2</sup>, 彭韬<sup>2</sup>, 李芸茜<sup>2</sup>, 曹伯良<sup>3△</sup>

(1. 浙江省肿瘤医院病理科,浙江杭州 310022;2. 南京医科大学基础医学院病理科,江苏南京 210029;3. 美国温安洛研究所,密歇根州大急流城 49503)

**摘要:**目的 评价 MET4 和 C-28 抗体检测卵巢上皮性肿瘤组织中 MET 蛋白表达的效能。方法 采用免疫组织化学间接法检测卵巢上皮性肿瘤、卵巢转移性腺癌和正常卵巢组织芯片中 MET 蛋白表达的情况,采用 Nuance 光谱成像分析系统对组织芯片的免疫染色进行分析。结果 MET4 和 C-28 蛋白阳性染色部位均位于细胞膜和细胞质。MET4 蛋白的阳性总检出率为 64.2% (111/173), 高于 C-28 [50.2% (87/173)] ( $P < 0.05$ ), 且 MET4 蛋白在卵巢原发性上皮性肿瘤组织中的阳性表达率显著高于卵巢转移性腺癌 ( $P < 0.05$ )。MET4 和 C-28 蛋白阳性表达与卵巢上皮性肿瘤患者的临床病理参数无显著关系。MET4 蛋白在细胞质、C-28 蛋白在细胞膜的阳性表达与病理分级显著相关 ( $P < 0.05$ )。结论 与 C-28 蛋白比较, MET4 蛋白具有更高的特异性和检出率,可能具有更好的临床应用前景。

**关键词:**卵巢肿瘤; 免疫组织化学; 芯片分析技术; MET 蛋白; C-28 蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.09.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)09-1065-04

## A comparative study on MET protein expression in ovarian epithelial tumor tissue by MET4 and C-28 antibody detection

Guo Zhenying<sup>1</sup>, Huang Yan<sup>2</sup>, Peng Tao<sup>2</sup>, Li Yunqian<sup>2</sup>, Cao Boliang<sup>3△</sup>

(1. Department of Pathology, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310022, China;  
2. Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China; 3. Van Andel Institute, Grand Rapids, MI 49503, USA)

**Abstract:** Objective To evaluate performances of MET4 and C-28 antibody in detection of MET protein expression in ovarian epithelial tumor tissue. Methods Indirect immunohistochemical method was employed to detect MET protein expression in tissue microarray of ovarian epithelial tumor, ovarian metastatic adenocarcinoma and normal ovarian. Analysis of immunostaining was performed by Nuance spectral imaging analytic system. Results Positive staining of MET4 and C-28 protein located in cellular membrane and cytoplasm. Total detection rate of MET4 protein was 64.2% (111/173), which was higher than that of C-28 [50.2% (87/173)] ( $P < 0.05$ ). Positive expression rate of MET4 protein in primary ovarian epithelial tumors was significantly higher than that of ovarian metastatic adenocarcinoma ( $P < 0.05$ ). Positive expression rates of MET4 and C-28 protein showed no significant correlation with clinicopathological parameters. However, the positive expression of MET4 protein in cytoplasm and C-28 protein in cellular membrane correlated to pathological grading markedly ( $P < 0.05$ ). Conclusion Compared to C-28 protein, MET4 protein probably has better prospects for clinical application with higher specificity and detection rate.

**Key words:** ovarian neoplasms; immunohistochemistry; microchip analytical procedures; protein, MET; protein, C-28

酪氨酸激酶类受体 MET 及其配体肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)信号通路因能刺激肿瘤细胞运动和诱导血管生成而被认为与肿瘤细胞的侵袭、转移密切相关<sup>[1-2]</sup>。近年研究发现 MET 受体的表达是卵巢癌的一个独立预后因子,并且是抑制其腹膜播散和浸润的有效靶点<sup>[3-4]</sup>。目前有 10 余种靶向 HGF/MET 的抗肿瘤药物进入了临床试验。本实验室采用单克隆抗体技术和噬菌体表面展示筛选技术已成功制备一株针对人 MET 胞外段的鼠源性单克隆抗体,命名为 MET4<sup>[5]</sup>。本研究比较分析 MET4 和实验室广泛使用的 C-28 在人卵巢上皮性肿瘤及卵巢转移性癌中的免疫组织化学染色结果,为 MET4 作为诊断试剂应用于实验室和临床做前期研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 组织芯片 卵巢上皮性肿瘤、卵巢转移性腺癌和正常卵巢组织芯片(批号:CC11-01-003,陕西超英生物科技有限公司)

司)由中性甲醛溶液固定,石蜡包埋。有效病例数 196 例,其中,卵巢上皮性肿瘤 173 例,患者年龄 19~72 岁(中位 49.0 岁),肿瘤病理类型:浆液性乳头状腺癌 136 例,黏液性乳头状腺癌 31 例,交界性浆液性肿瘤 1 例,子宫内膜样腺癌 4 例,移行细胞癌 1 例;卵巢转移性腺癌 15 例,年龄 30~69 岁(中位 44.5 岁);正常卵巢组织 8 例,年龄 40~69 岁(中位 48.5 岁)。芯片上每个组织点直径为 1.5 mm。

1.1.2 试剂 鼠抗单克隆抗体 MET4 由本实验室前期研究制备;兔抗 MET 多克隆抗体 C-28(sc-161)购自美国 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔 IgG(P0448)、HRP 标记的羊抗鼠 IgG(P0447)、二氨基联苯胺(3, 3'-diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒(K3467)、Mayer's 苏木素复染剂(S3309)均购自丹麦 DAKO 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学检测 采用免疫组织化学间接法检测石

蜡标本中 MET 蛋白的表达水平。组织芯片常规脱蜡、水化, 3% 过氧化氢处理 10 min 后, 于 pH 6.0 柠檬酸缓冲液中微波修复抗原 15 min, 室温自然冷却, 滴加第一抗体 MET4 (2 mg/mL, 1:300 稀释)、C-28(1:200 稀释), 4 °C 孵育过夜, 次日采用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS) 清洗 3 次, 10 min/次, 滴加 HRP 标记的第二抗体, 37 °C 孵育 45 min, DAB 显色, 苏木素复染, 脱水、透明、封片。以 0.01 mol/L 的 PBS(pH 7.4) 和正常羊血清分别替代第一抗体和第二抗体作为阴性对照。

**1.2.2 定量图像分析** 采用美国剑桥科研仪器公司(Cambridge Research and Instrumentation Inc, CRI) 的 Nuance 光谱成像分析系统分析组织芯片<sup>[6-7]</sup>。步骤如下:(1)每个组织点采集 2~3 个图像立体块(Cube), 在光谱波长 420~720 nm 之间, 每 20 nm 采集 1 次, 共 20 余张图像形成一个图像立体块;(2)将获得的图像立体块转化为光密度单位;(3)通过计算机频谱分割, 将 DAB 棕色和苏木素蓝色分别转化为假彩色棕色和假彩色蓝色;(4)经本实验室前期研究的计算机软件分析, 定量计算选定区域内棕色的平均光密度和像素数, 并计算出棕色占整个面积的百分比。

**1.2.3 结果判定标准** 阳性染色为棕黄色或棕褐色, 定位于上皮细胞质和细胞膜。每个组织点选取 2~3 个高倍视野, 采

用 Nuance 光谱成像分析系统对染色阳性细胞范围评分, 0 分: 全片未见着色或少于 5% 的细胞散在着色; 1 分: 5%~<25% 的细胞着色; 2 分: 25%~<50% 的细胞呈阳性; 3 分: 50%~<75% 的细胞染色阳性; 4 分: ≥75% 的细胞染色阳性。以染色评分不低于 2 分为染色阳性表达。

**1.3 统计学处理** 采用染色结果和临床病理资料建立数据库, 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组间平均值的比较采用 t 检验, 率的比较采用  $\chi^2$  检验, 不同年龄组和不同病理类型中染色差异的比较采用非参数检验, 采用斯皮尔曼等级相关(Spearman rank correlation)分析阳性染色的相关性, 以  $\alpha=0.05$  为检验水准, 以  $P<0.05$ (双尾) 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 卵巢上皮性肿瘤中 MET、C-28 蛋白的表达定位** MET、C-28 蛋白定位于卵巢上皮性肿瘤的细胞质和细胞膜, 呈棕黄色或棕褐色颗粒染色。按评分标准分别对肿瘤细胞的细胞质及细胞膜染色进行评价。MET4、C-28 在正常卵巢中无染色; MET4 在黏液性乳头状腺癌中呈棕黄色染色, 在浆液性乳头状腺癌中呈棕黄色染色; C-28 在浆液性乳头状腺癌中呈浅棕色染色, 在浆液性乳头状腺癌中呈棕黄色染色, 见图 1。

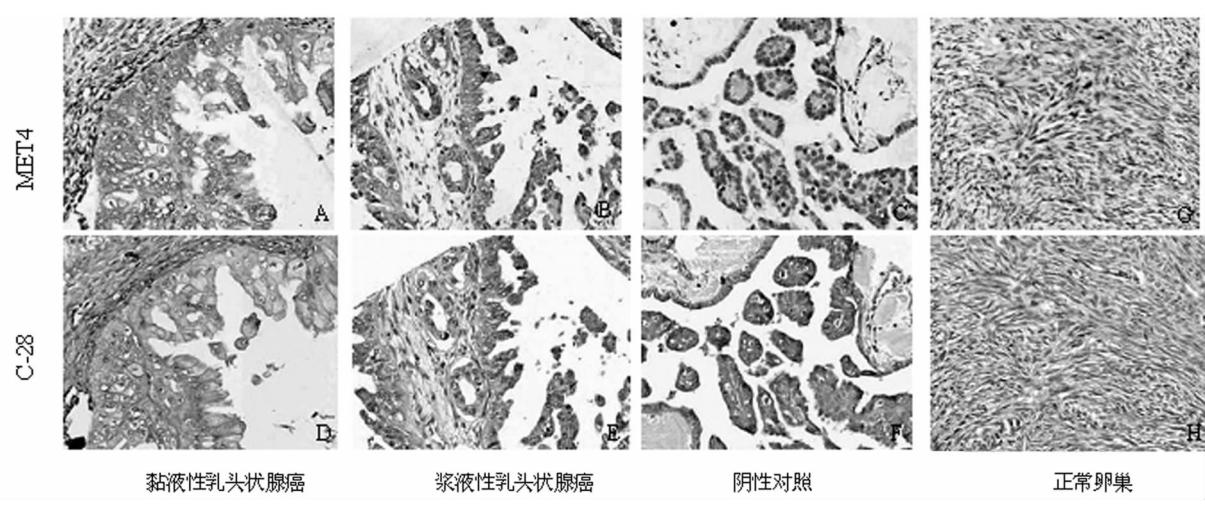


图 1 MET4 和 C-28 蛋白在卵巢上皮性肿瘤和正常卵巢组织中的表达(免疫组织化学  $\times 200$ )

表 1 卵巢上皮性肿瘤组织芯片中 MET4、C-28 蛋白阳性检出率的比较

组织类型	n	MET4 蛋白			总检出率 (%)	C-28 蛋白		
		细胞膜 (n)	细胞质 (n)	细胞膜和细胞质 (n)		细胞膜 (n)	细胞质 (n)	细胞膜和细胞质 (n)
卵巢上皮性肿瘤组织	173	32	97	18	64.2	21	81	15
卵巢转移性腺癌组织	15	0	3	0	20.0	2	7	2
正常卵巢组织	8	0	0	0	0.0	0	0	0

表 2 MET4 与 C-28 蛋白阳性表达之间的关系(n)

MET4 蛋白	n	C-28 蛋白	
		阳性	阴性
n	173	87	86
阳性	111	52	59
阴性	62	35	27

**2.2 MET4 和 C-28 蛋白免疫组织化学染色结果比较** 在卵巢上皮性肿瘤组织中, MET4 蛋白阳性检出率为 64.2%(111/173), 高于 C-28 蛋白的阳性检出率[50.2%(87/173)], 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 在卵巢转移性腺癌组织中, MET4 蛋白阳性检出率为 20%(3/15), C-28 蛋白阳性检出率为 47%(7/15); 在正常卵巢组织中, MET4 和 C-28 均无染色, 见表 1。MET4 和 C-28 蛋白共同检出为阳性的有 52 例, MET4 检出阳

性而 C-28 未检出阳性的有 59 例,C-28 检出阳性而 MET4 未检出阳性有 35 例,见表 2。

### 2.3 MET4 和 C-28 蛋白阳性染色与临床病理参数间关系

MET4 和 C-28 蛋白阳性表达与卵巢上皮性肿瘤患者的临床病理参数无显著关系。MET4 在细胞质、C-28 在细胞膜的阳性表达与病理分级显著相关( $P<0.05$ )。

## 3 讨 论

癌基因 MET 编码的酪氨酸激酶受体及其配体 HGF 在卵巢癌的侵袭行为中起重要作用。约 70% 的人卵巢癌中表达 MET 蛋白,且约 30% 过表达<sup>[8-10]</sup>。MET 蛋白过表达患者的总生存时间(17 个月)显著低于 MET 阴性患者(32 个月)<sup>[4]</sup>,MET 蛋白在卵巢上皮性肿瘤组织中过表达表明预后差<sup>[11-12]</sup>。同时,在卵巢上皮性肿瘤患者的腹水中发现高水平 HGF<sup>[13]</sup>。HGF 具有显著促进卵巢癌细胞生长和侵袭的能力<sup>[14]</sup>,且研究发现,采用中和抗体、拮抗剂或小干扰 RNA 下调 MET 蛋白的表达能够阻断 HGF 的作用,并在体内实验中抑制卵巢癌细胞的腹膜播散和腹水形成<sup>[15-16]</sup>。口服小分子 MET 抑制剂(PF-2341066)在卵巢癌转移模型中可有效降低肿瘤负荷,延长生存时间<sup>[17]</sup>。因此,MET/HGF 通路可能是干预治疗卵巢上皮性肿瘤的潜在靶点<sup>[18]</sup>。

目前 MET 抑制剂的研究取得了令人鼓舞的成果。一些胃癌细胞和非小细胞肺癌细胞系对 MET 抑制剂敏感。HGF/MET 自分泌回路活化或者经 MET 基因扩增的细胞系经 MET-酪氨酸蛋白激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)处理后凋亡<sup>[19]</sup>。临床前研究发现,MET 抑制剂或 HGF 中和剂影响动物模型中肿瘤发生和肿瘤细胞的转移概率。已有一些项目进入临床试验:(1) Tivantinib(ARQ197)<sup>[20]</sup>, I 期试验显示 27% 的患者疾病稳定超过 4 个月,II 期试验联合 Erlotinib,患者反应率和总生存率有所增加。目前已进入 III 期临床试验,用于治疗转移性非小细胞肺癌。(2) Cabozantinib(XL184)<sup>[21]</sup>,Cabozantinib 是多激酶抑制剂,靶向 MET、血管表皮生长因子受体 2(vascular epidermal growth factor receptor 2, VEGFR2)等。II、III 期临床试验表明,60% 胶质母细胞瘤患者的肿瘤体积明显减小,且总疾病控制率达到 50%。(3) Foretinib(XL880)<sup>[22]</sup>,靶向 MET 和 VEGFR2, I 期试验显示 55% 的患者稳定病情,目前联合 Erlotinib 进入 II 期试验。(4) Crizotinib(PF02341066)<sup>[23]</sup>,同时抑制 MET 和间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK),III 期临床试验表明对 MET 或 ALK 阳性的患者均有抑制肿瘤生长和转移的作用。

还有一些 MET 靶向制剂是单克隆抗体,如:(1) Rilotumumab(AMG102)<sup>[24]</sup>,抗 HGF 单克隆抗体通过中和 HGF 而干扰 MET 受体的活性,单独或联合表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)阻断抗体 Panitumumab 进入 I、II 期临床试验。(2) MetMAb(OA-5D5),是一种单价拮抗抗体,能抑制胶质母细胞瘤 U87 细胞系和胰腺癌 BxPC3、KP4 细胞系的细胞增殖和运动能力。II 期临床试验联合 Erlotinib 用于非小细胞肺癌,患者生存期从 6.4 个月延长至 12.4 个月<sup>[25]</sup>。

实验室前期通过单克隆抗体技术和噬菌体表面展示筛选技术获得 1 株鼠源性单克隆抗体 MET4,可特异性结合石蜡包埋组织中 MET 受体的胞外段,对多种肿瘤细胞进行 Western blot、免疫组织化学和免疫荧光染色分析,实验结果显示 MET4 的特异性、敏感性、可重复性均优于市场上其他抗 MET

抗体<sup>[5]</sup>。

本研究采用 Nuance 光谱成像分析系统定量分析组织芯片的免疫组织化学染色结果,证实了 MET4 能特异结合卵巢上皮性肿瘤细胞表面的 MET 受体。MET 受体表达水平与卵巢上皮性肿瘤患者的年龄和病理类型无显著相关性。MET4 蛋白的细胞质表达阳性、C-28 蛋白的细胞膜表达阳性与病理分级有关。比较 MET4 与 C-28 蛋白阳性染色结果,2 个抗体阳性染色部位均位于细胞膜和细胞质,在卵巢原发性上皮性肿瘤中,MET4 蛋白的阳性总检出率高于 C-28 蛋白,且 MET4 蛋白在卵巢原发性上皮性肿瘤中的阳性率显著高于卵巢转移性腺癌,因此,MET4 有更好的特异性和更高的检出率。今后受益于靶向阻断 HGF/MET 信号通路的肿瘤治疗和筛选的肿瘤患者将会更多,MET4 可能具有更高的临床应用价值。

## 参考文献

- Cecchi F, Daniel CR, Bottaro DP. Targeting the HGF/Met signaling pathway in cancer[J]. Eur J Cancer, 2010, 46(7): 1260-1270.
- Eder JP, Vande Woude GF, Boerner SA, et al. Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signaling pathway in cancer [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(7): 2207-2214.
- Wong AS, Roskelley CD, Pelech S, et al. Progressive changes in Met-dependent signaling in a human ovarian surface epithelial model of malignant transformation[J]. Exp Cell Res, 2004, 299(1): 248-256.
- Sawada K, Radjabi AR, Shinomiya N, et al. c-Met overexpression is a prognostic factor in ovarian cancer and an effective target for inhibition of peritoneal dissemination and invasion [J]. Cancer Res, 2007, 67(4): 1670-1679.
- Knudsen BS, Zhao P, Resau J, et al. A novel multipurpose monoclonal antibody for evaluating human c-Met expression in preclinical and clinical settings[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2009, 17(1): 57-67.
- Rojo MG, Bueno G, Slodkowska J. Review of imaging solutions for integrated quantitative immunohistochemistry in the Pathology daily practice[J]. Folia Histochem Cytophobiol, 2009, 47(3): 349-354.
- Qian CN, Berghuis B, Tsarfaty G, et al. Preparing the "soil": the primary tumor induces vasculature reorganization in the sentinel lymph node before the arrival of metastatic cancer cells[J]. Cancer Res, 2006, 66(21): 10365-10376.
- Aune G, Lian AM, Tingulstad S, et al. Increased circulating hepatocyte growth factor (HGF): a marker of epithelial ovarian cancer and an indicator of poor prognosis[J]. Gynecol Oncol, 2011, 121(2): 402-406.
- Yamamoto S, Tsuda H, Miyai K, et al. Gene amplification and protein overexpression of Met are common events in ovarian clear-cell adenocarcinoma: their roles in tumor progression and prognostication of the patient[J]. Mod Pathol, 2011, 24(8): 1146-1155.
- Ma PC, Tretiakova MS, Mackinnon AC, et al. Expression and mutational analysis of Met in human solid cancers[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2008, 47(12): 1025-1037.
- Bu R, Uddin S, Bavi P, et al. HGF/c-Met pathway has a prominent role in mediating antiapoptotic signals through AKT in epithelial ovarian carcinoma[J]. Lab Invest, 2011, 91(1): 124-137.
- Koon EC, Ma PC, Salgia R, et al. Effect of a c-Met-specific, ATP-competitive small-molecule inhibitor SU11274 on human ovarian carcinoma cell growth, motility, and invasion[J]. Int J Gynecol

- Cancer, 2008, 18(5):976-984.
- [13] Baykal C, Demirtas E, Al A, et al. Comparison of hepatocyte growth factor levels of epithelial ovarian cancer cyst fluids with benign ovarian cysts[J]. Int J Gynecol Cancer, 2003, 14(1):152-156.
- [14] Zhou HY, Wong AS. Activation of p70S6K induces expression of matrix metalloproteinase 9 associated with hepatocyte growth factor-mediated invasion in human ovarian cancer cells[J]. Endocrinology, 2006, 147(5):2557-2566.
- [15] Sowter HM, Corps AN, Smith SK. Hepatocyte growth factor (HGF) in ovarian epithelial tumour fluids stimulates the migration of ovarian carcinoma cells[J]. Int J Cancer, 1999, 83(4):476-480.
- [16] Matsumoto K, Nakamura T. NK4 (HGF-antagonist/angiogenesis inhibitor) in Cancer biology and therapeutics[J]. Cancer Sci, 2003, 94(4):321-327.
- [17] Zillhardt M, Christensen JG, Lengyel E. An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, reduces tumor burden and metastasis in a preclinical model of ovarian cancer metastasis [J]. Neoplasia, 2010, 12(1):1-10.
- [18] Zhou HY, Pon YL, Wong AS. HGF/MET signaling in ovarian cancer[J]. Curr Mol Med, 2008, 8(6):469-480.
- [19] Pan BS, Chan GK, Chenard M, et al. MK-2461, a novel multitar- geted kinase inhibitor, preferentially inhibits the activated c-Met receptor[J]. Cancer Res, 2010, 70(4):1524-1533.
- [20] Yap TA, Olmos D, Brunetto AT, et al. Phase I trial of a selective c-MET inhibitor ARQ 197 incorporating proof of mechanism pharmacodynamic studies[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(10):1271-1279.
- [21] Wakelee HA, Gettinger SN, Engelman JA, et al. A phase Ib/II study of XL184 (BMS 907351) with and without erlotinib (E) in patients (pts) with non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(15 Suppl):S3017.
- [22] Eder JP, Shapiro GI, Appleman LJ, et al. A phase I study of foretinib, a multi-targeted inhibitor of c-Met and vascular endothelial growth factor receptor 2[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(13):3507-3516.
- [23] Ou SH, Kwak EL, Siwak-Tapp C, et al. Activity of crizotinib (PF02341066), a dual mesenchymal-epithelial transition (Met) and anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor, in a non-small cell lung cancer patient with de novo Met amplification[J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(5):942-946.
- [24] Giordano S. Rilotumumab, a mAb against human hepatocyte growth factor for the treatment of cancer[J]. Curr Opin Mol Ther, 2009, 11(4):448-455.
- [25] Zhou C, Wu YL, Chen G, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study[J]. Lancet Oncol, 2011, 12(8):735-742.

(收稿日期:2012-12-07)

(上接第 1064 页)

发现 rt194 的突变,说明本院 HBV 耐药主要针对拉米夫定、替比夫定、恩曲他滨,而对其他核苷类药物的耐药比较少见。在联合突变方面,在已发生 rt204 位点突变的 HBV 中有 50% 伴 rt180 位点的突变,而 rt180 位点突变均伴随 rt204 位点突变,这种 rt180 联合 rt204 突变的 HBV,与 rt204 单独突变相比,其对恩替卡韦及替比夫定敏感性显著降低<sup>[6-7]</sup>;而存在 2 个以上位点突变的 HBV 中,主要是 rt204 和(或)rt180 联合其他位点突变,这种多位点的联合突变不但增加了 HBV 耐药的复杂性及疾病的难治性,对 HBV 的其他生物学特性的影响也值得进一步探讨。在本研究中,rt181 位点突变率较低,这与曹亦菲等<sup>[5]</sup>、李敏伟等<sup>[8]</sup>的研究结果有差异,可能与本研究病例较少有关,但是是否存在地区差异等原因还值得进一步研究。在突变类型方面,以 rtM204I 最为常见,其次是 rtN/H238T 与 rtL180M,本研究还在 2 例 HBV 中发现阿德福韦相关的少见突变类型 N/H238A,在 1 例 HBV 中发现恩替卡韦相关的少见突变类型 I169M,这种少见突变类型的临床意义有待进一步研究。

在应用核苷类似物治疗慢性乙型肝炎的过程中,随着用药时间的延长,RT 基因耐药相关性变异是难以避免的,因此,采用核苷类药物治疗的慢性乙型肝炎患者,有必要在选用核苷类药物治疗前或治疗过程中定期进行 HBV RT 基因序列分析,从而选择更有效的抗病毒药物,以提高抗病毒治疗的疗效。

## 参考文献

- [1] 汪莉萍, 韩方正, 李春杨, 等. 慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗前

- HBV P 区基因序列测定的意义[J]. 中华临床感染病杂志, 2011, 4(5):303-305.
- [2] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(6):324-329.
- [3] Ghany MG, Doo EC. Antiviral resistance and hepatitis B therapy [J]. Hepatology, 2009, 49(5 Suppl):S174-184.
- [4] 徐东平, 刘妍, 成军, 等. 340 例慢性乙型肝炎患者乙型肝炎病毒多位点耐药相关突变分析[J]. 中华肝脏病杂志, 2008, 16(10):735-738.
- [5] 曹亦菲, 何平, 谭晓华. 1012 例乙肝病毒患者 HBV P 区基因位点变异分析[J]. 健康研究, 2011, 31(1):17-20.
- [6] Tenney DJ, Levine SM, Rose RE, et al. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(9):3498-3507.
- [7] Levine S, Hernandez D, Yamanaka G, et al. Efficacies of entecavir against lamivudine-resistant hepatitis B virus replication and recombinant polymerases in vitro[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(8):2525-2532.
- [8] 李敏伟, 陈智, 邵骏斌, 等. 拉米夫定耐药者 HBVP 基因 rtL180M 和 rtM204V/I 突变分析[J]. 中华传染病杂志, 2005, 23(3):176-177.

(收稿日期:2013-01-27)