

乙型肝炎病毒表面抗原特异性结合肽的筛选与鉴定^{*}

孙 鸣^{1,2}, 马智勇², 黄朝阳³, 胡 斌^{3△}, 沈关心² (1. 厦门大学附属第一医院生殖医学科, 福建 厦门 361003; 2. 华中科技大学同济医学院免疫学系, 湖北武汉 430030; 3. 厦门大学附属第一医院检验科, 福建厦门 361003)

【摘要】 目的 筛选并鉴定与乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)特异性结合的多肽。**方法** 将酵母表达的 HBsAg 包被在微孔板上, 加入噬菌体进行随机肽库筛选, 经过 4 轮筛选后, 随机挑取 15 个克隆进行 DNA 测序, 并通过夹心 ELISA 方法鉴定其亲和力, 采用剂量依赖结合实验和竞争抑制实验检测其与 HBsAg 结合的特异性。**结果** 经过 4 轮筛选, 得到一优势克隆 No. 3, 展示肽段为 SSYAPYVWQPIA, 与 HBsAg 有较强的亲和力, 剂量依赖结合实验和竞争抑制实验证明克隆 No. 3 与 HBsAg 的结合是特异性的。**结论** 利用噬菌体展示肽库技术可以获得 HBsAg 特异性结合肽, 此多肽可以作为靶向分子用于乙型肝炎的基因治疗, 为乙型肝炎的靶向基因治疗奠定实验基础。

【关键词】 乙型肝炎病毒; 乙型肝炎病毒表面抗原; 噬菌体展示; 结合肽

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2014. 05. 001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)05-0577-03

Screening and identification of HBV surface antigen specific binding peptide^{*} SUN Ming^{1,2}, MA Zhi-yong², HUANG Chao-yang³, HU Bin^{3△}, SHEN Guan-xin² (1. Department of Reproductive Medicine, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen, Fujian 361003, China; 2. Department of Immunology, Tongji Medical college, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China; 3. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen, Fujian 361003, China)

【Abstract】 Objective To select and identify the peptide that specifically binds with HBV surface antigen(HBsAg). **Methods** HBsAg derived from yeast was coated on milipore plate, phage was added to screen peptide randomly. After four rounds of screening, 15 phage clones were selected randomly, the phage DNA were extracted and sequenced. And their affinities were identified by the sandwich ELISA, the specificity was identified by the dose dependent binding test and competitive inhibition test. **Results** After four rounds screening, a predominant phage clone No. 3 was obtained which could comparatively strong bind with HBsAg, and this clone displayed a peptide sequence of SSYAPYVWQPIA. HBsAg dose dependent binding test and competitive inhibition test showed that No. 3 binding with HBsAg was specific. **Conclusion** Peptides specifically binding to HBsAg could be obtained through the screening of phage display peptide library. These peptides may be used in target gene therapy of hepatitis B. It will provide experiment foundation of target gene therapy of HBV infection.

【Key words】 hepatitis B virus; HBsAg; phage display; binding peptide

乙型肝炎病毒(HBV)是一种嗜肝 DNA 病毒, 是导致人类急性和慢性乙型肝炎的主要原因。目前在乙型肝炎治疗方面, 基于 RNA 干扰的基因治疗成为 HBV 感染者新的治疗策略^[1-5]。但是, 如何将 siRNA 或 siRNA 表达盒靶向导入 HBV 感染的肝细胞是目前应用 RNA 干扰治疗 HBV 感染的主要难题之一^[6]。乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)表达于 HBV 感染的肝细胞表面, 而未感染的肝细胞不表达此抗原, 是 HBV 基因治疗的良好靶分子^[4]。噬菌体展示技术是将外源的重组肽、蛋白质包括抗体片段融合到噬菌体衣壳蛋白上的一项基因技术, 是筛选特定分子、细胞甚至组织特异性小分子多肽的有利工具。本研究以 HBsAg 作为靶物质, 应用噬菌体展示肽库技术筛选可以与 HBsAg 特异性结合的短肽序列, 期望以此短肽为桥梁介导 siRNA 分子结合 HBV 感染的肝细胞, 为乙型肝炎的靶向基因治疗研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料来源 Ph. D.-12TM 噬菌体随机肽库购自 New

England Biolabs 公司(E8111L), 库浓度为 1.0×10^{13} pfu/mL, 宿主菌为 *E. coli* 2738, -96g III 自动测序引物(5'-CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3')由上海生物工程技术有限公司合成。试剂: HRP 标记的抗 M13 蛋白 VIII 单克隆抗体(# 27-9421-01, anti-M13 phage VIII, 1 : 5 000 稀释工作浓度)购自 GE healthcare 公司。酵母表达的 HBsAg 由武汉生物制品研究所馈赠。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体随机肽库筛选结合 HBsAg 的特异性多肽 将酵母表达的 HBsAg 抗原用 0.1 mol/L 碳酸氢钠(NaHCO₃, pH 8.6)包被缓冲液稀释成 70 μg/mL, 每孔 100 μL 包被 96 微孔板, 4 ℃ 孵育过夜。倒掉包被液, 每孔加满封阻液[0.1 mol/L NaHCO₃, 5 mg/mL 牛血清清蛋白(BSA), 0.02% 的 NaN₃], 4 ℃ 封阻 2 h。用 TBST(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20)快速洗板 6 次, 每孔加入 1.0×10^{11} pfu

^{*} 基金项目: 福建省自然科学基金青年项目(2011D012)。

作者简介: 孙鸣, 女, 主管技师, 硕士研究生, 主要从事生殖免疫方向研究。 △ 通讯作者, E-mail: hubin_sm@126.com。

的噬菌体,室温轻摇震荡 60 min,弃去未结合的噬菌体液,用 TBST 洗板 10 次,每孔加入非特异性盐酸甘氨酸洗脱液(0.2 mol/L Glycine-HCl,pH 2.2,1 mg/mL BSA)100 μ L,室温轻摇 10 min,洗脱特异性结合的噬菌体,收集洗脱液于微量离心管,加入中和缓冲液 15 μ L(1 mol/L Tris-HCl,pH 9.1),留取 5 μ L 用于滴度测定,剩余洗脱物感染宿主菌 ER2738 进行扩增,回收后测滴度用于下一轮筛选。以上述方法进行后面 3 轮筛选,使结合 HBsAg 的噬菌体克隆得到富集。

1.2.2 特异性结合 HBsAg 的噬菌体克隆测序 经 4 轮筛选后,随机挑取 15 个噬菌体克隆,提取 DNA 送公司测序。具体操作如下:将单个噬菌体克隆加入 1 mL ER2738 培养物中进行小量扩增,取扩增液 500 μ L,加入 200 μ L PEG/NaCl,混匀,室温放置 10 min;10 000 r/min,离心 10 min,弃上清液,加 100 μ L 碘化物缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0,1 mmol/L EDTA,4 mol/L NaI)和 250 μ L 无水乙醇悬浮沉淀,室温温育 10 min;10 000 r/min,离心 10 min,弃上清液,用 70%乙醇 500 μ L 洗沉淀,再离心去上清液并晾干沉淀,灭菌超纯水 30 μ L 悬浮即得高质量的噬菌体克隆 DNA。琼脂糖凝胶电泳鉴定后,用肽库-96gIII 自动测序引物送上海生物工程有限公司测序。

1.2.3 ELISA 鉴定特异性结合 HBsAg 多肽的亲和力 用包被缓冲液将 HBsAg 稀释成 20 μ g/mL,以每孔 100 μ L 包被微孔板,密封湿盒中 4 $^{\circ}$ C 过夜。弃包被液,每孔加满封阻液,4 $^{\circ}$ C 封阻 2 h。0.5% TBST 洗板 6 次,然后按所测定的噬菌体滴度每孔加入 5.0×10^{10} pfu 的噬菌体,室温作用 2 h,0.5%Tween-20 TBST 洗板 6 次,再加入 HRP 标记的 anti-M13 phage VIII(1:5 000)抗体,作用 1 h,0.5%Tween-20 TBST 洗板 6 次,加入 TMB 显色液和终止液。以酶标仪读取 A450 值。同时以 20 μ g/mL BSA 100 μ L 包被微孔板作无关蛋白对照。

1.2.4 剂量依赖结合实验鉴定特异性结合 HBsAg 多肽的特异性 将 HBsAg 和无关蛋白 m1ECD(小鼠肝脏去唾液酸糖蛋白受体大亚基胞外段)以不同浓度(1、2.5、10、40、70 μ g/mL)每孔 100 μ L 包被微孔板,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,并用封阻液 4 $^{\circ}$ C 封闭 2 h,0.5%TBST 洗板 6 次。每孔加入 5.0×10^{10} pfu 的 No.3 号噬菌体和原库,室温作用 2 h,0.5%Tween-20 TBST 洗板 6 次,再加入 HRP 标记的 anti-M13 phage VIII(1:5 000)抗体,作用 1 h,0.5%Tween-20 TBST 洗板 6 次,加入 TMB 显色液和终止液。以酶标仪读取 A450 值。

1.2.5 竞争抑制实验鉴定特异性结合 HBsAg 多肽的特异性 按上述方法用 20 μ g/mL HBsAg 每孔 100 μ L 包被微孔板。将不同浓度 140、70、40、20、10 μ g/mL 的 HBsAg 取 100 μ L 与 1.0×10^{10} pfu No.3 号噬菌体上清液混匀,室温作用 2 h。混匀物加入 HBsAg 包被微孔板内,室温震荡 2 h,0.5%TBST 洗板 6 次,加入 HRP 标记的 anti-M13 phage VIII(1:5 000)抗体孵育 1 h,再用 0.5%TBST 洗板 6 次,加入 TMB 显色液和终止液。以酶标仪读取 A450 值。

1.3 仪器与试剂 TMB ELISA 显色液和终止液购自上海科华生物技术有限公司。其他试剂均为本室配置。主要仪器:高速离心机(Beckman JA-25.50)、低温离心机(Sigma 3-16K)、酶标仪(Thermo multiskan MK3)等。

2 结 果

2.1 特异性结合 HBsAg 多肽的筛选 以酵母表达的 HBsAg 作为靶分子,对噬菌体十二肽库进行了 4 轮筛选,第 4 轮回收率(回收/投入)比第 1 轮增加了 20 倍(表 1)。又进行了轮次 ELISA 鉴定,用 ELISA 鉴定每轮洗脱物扩增后对 HBsAg 亲

和力的增加,与 HBsAg 结合的噬菌体得到了有效的富集,见图 1。

表 1 从噬菌体十二肽库筛选 HBsAg 结合肽

轮次	投入的肽库(pfu)	回收的肽库(pfu)	回收率
1	1.0×10^{11}	6.0×10^4	6.0×10^{-7}
2	1.0×10^{11}	4.8×10^5	4.8×10^{-6}
3	1.0×10^{11}	5.4×10^5	5.4×10^{-6}
4	1.0×10^{11}	1.2×10^6	1.2×10^{-5}

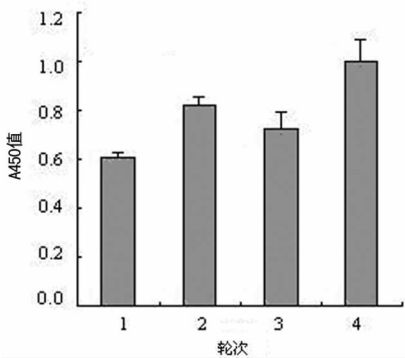


图 1 各轮洗脱物扩增后对 HBsAg 的结合

2.2 特异性结合 HBsAg 的噬菌体克隆测序 第 4 轮筛选完成后,从洗脱物测滴度平板随机挑取 15 个克隆,提取噬菌体 DNA 并送测序。结果显示存在 9 种多肽序列 No.1~No.9,其中 No.1~No.3 为优势序列。见表 2。

表 2 噬菌体克隆展示肽测序结果

克隆编号	克隆号	氨基酸序列	频率
No.1	1,8,11	AHRHPISFLSTL	3/15
No.2	3,7,12	ATWSHLSSAGL	3/15
No.3	5,9,13	SSYAPYVWQPIA	3/15
No.4	2	LPSPPRIPGHKL	1/15
No.5	4	MTKGSYSPSPWR	1/15
No.6	6	TRPAPPYQSQW	1/15
No.7	10	GHGLLQYTDVMF	1/15
No.8	14	SWPLYSRDSGLG	1/15
No.9	15	YQLRPNAESLRF	1/15

2.3 ELISA 鉴定特异性结合 HBsAg 多肽的亲和力 扩增 No.1~No.9 噬菌体,以噬菌体 ELISA 实验检测它们与 HBsAg 的结合情况,优势克隆 No.3 与 HBsAg 结合最强。结果见图 2。

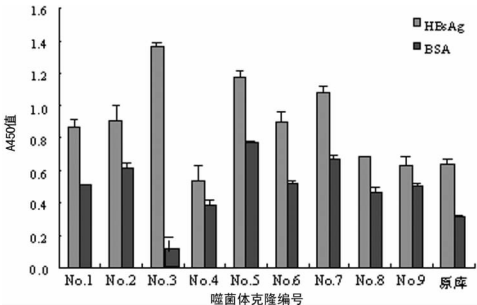


图 2 No.1~No.9 噬菌体的 ELISA 鉴定

2.4 剂量依赖结合实验鉴定特异性结合 HBsAg 多肽的特异性 No. 3 号噬菌体与 HBsAg 的结合,随着 HBsAg 包被浓度的增加而增加,而与无关蛋白 m1ECD 的结合没有这种剂量依赖性。见图 3。

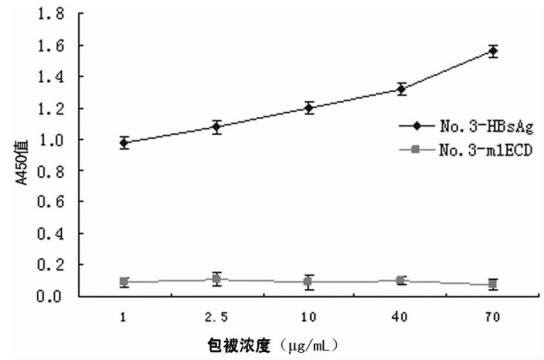


图 3 No. 3 号噬菌体与 HBsAg 的剂量依赖性结合

2.5 竞争抑制实验鉴定特异性结合 HBsAg 多肽的特异性 游离 HBsAg 与 No. 3 号噬菌体预先结合后,能够抑制噬菌体与包被 HBsAg 的结合,且游离 HBsAg 浓度越高,抑制作用越强。此外无关蛋白 m1ECD 对 No. 3 号噬菌体与包被的 HBsAg 结合没有抑制作用。见图 4。

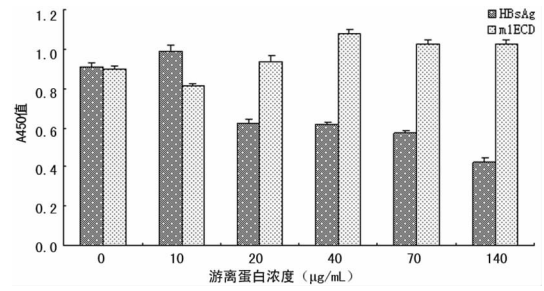


图 4 游离 HBsAg 对 No. 3 号噬菌体与包被 HBsAg 结合的抑制

3 讨 论

HBV 感染是全球重要的公共卫生问题^[7]。目前应用于慢性乙型肝炎治疗的药物主要是干扰素和核苷酸类似物,但干扰素因具有明显的不良反应限制了其长期应用,核苷酸类似物停药后易发生病毒 DNA 的反跳和肝功能异常^[8]。本研究室和国内外大量实验表明, RNA 干扰(RNAi)可以有效抑制 HBV 的复制和基因表达,有望成为一种新的 HBV 感染治疗策略^[1-5]。但是化学合成的 siRNA 和质粒或病毒载体表达的 shRNA 缺乏肝细胞和肝脏的靶向性,限制了 RNAi 技术在临床上的应用。如何将 siRNA 或 siRNA 表达盒靶向导入 HBV 感染的肝细胞,是将 RNAi 技术应用于 HBV 感染的临床研究必须予以解决的问题之一。目前有多种方法用于细胞靶向的 RNAi,包括细胞表面特异性蛋白的单链抗体(scFv)^[4,9]、适配子(apramer)^[10]所介导的 siRNA 导入,以及配体修饰的纳米颗粒^[11]介导的 siRNA 导入。它们共同点是找到了细胞特异性的蛋白分子,以此分子为靶标,再通过能与靶标分子特异结合的桥梁分子(如单链抗体、适配子等)介导 siRNA 导入。小分子多肽具有结构简单、分子量小、穿透性好、不易引起机体免疫应答等优点,可以作为一种良好的桥梁分子,而噬菌体肽库展示技术为筛选具有靶向作用的桥梁分子提供了一种有效的工具^[12]。本次技术方案是通过噬菌体肽库展示技术筛选靶向 HBV 感染肝细胞的靶向性多肽。在靶分子的选择方

面刚开始从两个方向考虑,一是 HBV 表达的蛋白分子,优点是特异性强,但表达丰度低;二是肝细胞表面特异性表达的分子,优点是表达丰度高,但特异性一般。最终选取 HBsAg 为靶分子,HBsAg 表达于 HBV 感染的肝细胞表面且表达丰度较高,未感染的肝细胞不表达此抗原,是靶向 HBV 感染的肝细胞最特异的靶分子^[13]。本研究以酵母表达的 HBsAg 作为靶物质,对噬菌体随机十二肽库进行了 4 轮筛选,第 4 轮的回收率比第 1 轮的回收率增加 20 倍,轮次 ELISA 鉴定发现与 HBsAg 结合的噬菌体得到了有效的富集。随机挑选了 15 个噬菌体克隆进行测序,并用 ELISA 方法检测各个克隆对 HBsAg 的亲合力,结果显示 1 个展示肽为 SSSYAPYVWQPIA 的优势噬菌体克隆(No. 3 号)对 HBsAg 具有较强的亲合力。随后的 HBsAg 剂量依赖结合实验中 No. 3 号噬菌体与 HBsAg 的结合随着 HBsAg 包被量的增加而增加,而与无关蛋白 m1ECD 的结合没有这种剂量依赖性,表明 No. 3 号噬菌体与 HBsAg 的结合是特异性的。进一步的竞争抑制实验,先用游离 HBsAg 与 No. 3 号噬菌体预先孵育后,能够抑制噬菌体与包被 HBsAg 的结合,且游离的 HBsAg 浓度越高,抑制作用越强,而无关蛋白 m1ECD 对 No. 3 号噬菌体与包被的 HBsAg 结合没有抑制作用,这个结果进一步证明了该噬菌体展示肽与 HBsAg 结合是特异性的,因此认为十二肽 SSSYAPYVWQPIA 可以作为桥梁分子用于乙型肝炎的基因治疗。

参考文献

[1] He F, Chen EQ, Liu L, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by hepatocyte nuclear factor 4- α specific short hairpin RNA[J]. Liver Int, 2012, 32(5): 742-751.

[2] 张正茂, 田拥军, 孟忠吉, 等. RNA 干扰抑制人乙型肝炎病毒复制的研究[J]. 中国病毒学, 2006, 21(4): 348-352.

[3] Wooddell CI, Rozema DB, Hossbach M, et al. Hepatocyte-targeted RNAi therapeutics for the treatment of chronic hepatitis B virus infection[J]. Mol Ther, 2013, 21(5): 973-985.

[4] Wen WH, Liu JY, Qin WJ, et al. Targeted inhibition of HBV gene expression by single-chain antibody mediated small interfering RNA delivery[J]. Hepatology, 2007, 46(1): 84-94.

[5] 蒋霞. 乙型肝炎病毒感染的免疫应答及其疫苗的应用[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(6): 720-722.

[6] Chen Y, Cheng GF, Mahato RI. RNAi for treating hepatitis B viral infection[J]. Pharm Res, 2008, 25(1): 72-86.

[7] Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection—natural history and clinical Consequences [J]. N Engl J Med, 2004, 350(11): 1118-1129.

[8] Hoofnagle JH. Hepatitis B—preventable and now treatable [J]. N Engl J Med, 2006, 354(10): 1074-1076.

[9] Song E, Zhu P, Lee SK, et al. Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors[J]. Nat Biotechnol, 2005, 23(6): 709-717.

[10] Ni X, Zhang Y, Ribas J, et al. Prostate-targeted radiosensitization via aptamer-shRNA chimeras in human tumor xenografts[J]. J Clin Invest, 2011, 121(6): 2383-2390.

[11] Hu-Lieskovan S, Heidel JD, Bartlett DW, et al. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, (下转第 582 页)

假单胞菌的生长。

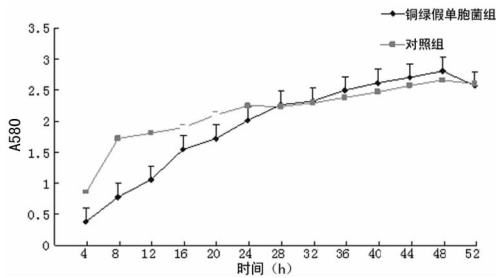


图 1 枸杞子对铜绿假单胞菌生长曲线的影响

3 讨 论

伴随分子生物学、生物化学和免疫学新技术的发展,许多研究者对于祖国传统中医中药的研发力度在逐步加强。宁夏回族自治区中宁县是全国枸杞的最好产地,宁夏地区食物中的含硒量极低,而通过生物技术培育的富硒枸杞,其抗氧化清除自由基的作用得到了强化^[7-8]。本研究初筛的枸杞抗菌活性物质是未知成分,其生物学性状未知,只能根据相关研究资料来设计实验方案。预期经过一步步实验得到比较理想的抗菌肽活性物质,为枸杞抗菌肽药效、药理学和抑菌机制的研究奠定了理论基础。

近年来,由于抗菌药物的广泛应用,耐药菌株逐年增多,据统计对青霉素 G 耐药的金黄色葡萄球菌已达 90% 以上,尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)已成为医院内感染最常见的致病菌^[9-11]。本文通过测定不同枸杞子浸出液对耐药菌的 MIC、MBC 和测量抑菌圈直径发现,不同枸杞子浸出液对耐药菌均有一定程度抑菌效果,其中对铜绿假单胞菌和大肠埃希菌的抑菌作用强,而对葡萄球菌的抑菌作用一般,对白色假丝酵母菌和克柔假丝酵母菌的抑菌作用相对较弱。初步分析,由于革兰阳性菌和革兰阴性菌细胞壁成分、结构不同,枸杞子对于革兰阴性菌的抑制作用明显好于革兰阳性菌^[12],这对临床治疗选择合适的抗生素带来了便利。

在医源性感染中由铜绿假单胞菌引起者占 10% 左右,在某些特殊病房中,如烧伤和肿瘤病房、各种导管和内镜的治疗与检查室内,铜绿假单胞菌的感染率可高达 30%。同时,铜绿假单胞菌对许多抗生素具有天然或获得性耐药性,甚至多重耐药,给临床治疗带来极大困难。而本研究通过测量 MIC、MBC 和抑菌圈直径发现枸杞子浸出液对铜绿假单胞菌的抑菌作用强,故绘制出铜绿假单胞菌在提取液中的生长曲线,希望能为研究枸杞子作为抗铜绿假单胞菌新药提供了基础理论依据。同时,充分利用枸杞资源,获得抗菌活性成分,有利于宁夏枸杞的生产,进而有利于发展本地经济,增加产区人们的经济收入,

同时减少抗生素的大量使用,保护环境。

参考文献

[1] Sze SC, Song JX, Wong RN, et al. Application of SCAR (sequence characterized amplified region) analysis to authenticate *Lycium barbarum* (wolfberry) and its adulterants[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2008, 51(1): 15-21.

[2] 黄泰康. 现代本草纲目[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001: 1891.

[3] Woodford N, Ellington MJ. The emergence of antibiotic resistance by mutation[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2007, 13(1): 5-18.

[4] Chen Z, Kwong Huat Tan B, Chan SH. Activation of T lymphocytes by polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* L[J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8(12): 1663-1671.

[5] Oppenheim JJ, Biragyn A, Kwak LW, et al. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity[J]. *Ann Rheum Dis*, 2003, 62 (Suppl 2): ii17-ii21.

[6] Chang RC, So KF. Use of Anti-aging Herbal Medicine, *Lycium barbarum*, Against Aging-associated Diseases. What Do We Know So Far[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2008, 28(5): 643-652.

[7] Chen R, Moriya J, Yamakawa J, et al. Traditional Chinese medicine for chronic fatigue syndrome[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2010, 7(1): 3-10.

[8] 郑英丽, 周子君. 抗生素滥用的根源、危害及合理使用的策略[J]. *医院管理论坛*, 2007, 24(1): 23-27.

[9] Stefani S. WS01 basic mechanisms of resistance to antibiotics[J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 2006, 29(1): 23-26.

[10] 刘畅, 樊明文. 针对细菌感染的治疗性疫苗研究进展[J]. *中国生物制品学杂志*, 2008, 21(5): 445-448.

[11] 陈彤彤, 宋晓妍, 解树涛, 等. 植物源抗菌肽的研究进展[J]. *西北植物学报*, 2006, 26(2): 420-426.

[12] Leung AY. Traditional toxicity documentation of Chinese *Materia Medica*—an overview[J]. *Toxicol Pathol*, 2006, 34(4): 319-326.

(收稿日期: 2013-09-17 修回日期: 2013-11-29)

(上接第 579 页)

nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(19): 8984-8992.

[12] Molek P, Strukelj B, Bratkovic T. Peptide phage display as a tool for drug discovery: targeting membrane receptors[J]. *Molecules*, 2011, 16(1): 857-887.

[13] Bohne F, Chmielewski M, Ebert G, et al. T cells redirected against hepatitis B virus surface proteins eliminate infected hepatocytes[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(1): 239-247.

(收稿日期: 2013-09-22 修回日期: 2013-11-20)