乙肝治疗耐药基因突变的焦磷酸测序技术诊断*

汪 钦[1] 郭晏海[1] 李勇年[2] 刘永兰[1] 包 晗[1] 赵锦荣[1] 梁 平[1] 雷小英[1]
张 菊[1] 颜 真[1△]

(1 第四军医大学药学院药物基因组学教研室 陕西 西安 710032 ;2 西安市 323 医院感染科 陕西 西安 710054)

摘要 目的:建立焦磷酸测序技术检测拉米夫定和阿德福韦酯治疗乙肝所致乙肝病毒基因耐药突变的定量检测方法,为临床乙肝耐药诊断和治疗提供依据。**方法:**针对乙肝病毒 DNA 聚合酶基因序列上 4 个常见基因突变位点的 6 种突变形式,分别克隆构建野生型和突变型质粒作为标准品,应用生物信息学手段设计目标基因通用 PCR 引物和各突变点的焦磷酸测序引物,建立焦磷酸测序的突变检测方法。对接受拉米夫定、阿德福韦酯治疗的慢性乙型肝炎患者血清标本进行检测。**结果:**构建了乙肝病毒四种常见耐药性突变的标准株和变异株克隆,建立了分别或同时检测拉米夫定、阿德福韦酯耐药突变的焦磷酸测序方法,对 68 例临床耐药或疑似耐药的患者血清标本进行检测,双脱氧测序验证,检出拉米夫定耐药突变 32 例,阿德福韦酯耐药突变 5 例,其中焦磷酸测序检出 20 例为混合突变,而双脱氧测序显示为 6 例。**结论:**成功建立了焦磷酸测序定量检测拉米夫定、阿德福韦酯耐药基因突变的方法,构建了乙肝病毒耐药基因突变的标准质粒,为临床动态监测乙肝病毒变异病毒株、指导合理用药奠定了基础。

关键词:乙肝; 耐药基因; 焦磷酸测序; 拉米夫定; 阿德福韦酯
中图分类号:R512.61 R284.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)10-1873-04

Pyrosequencing Diagnosis to Hepatitis B Gene Mutation Caused by Drug Resistance*

WANG Qin[1], GUO Yan-hai[1], LI Yong-nian[2], LIU Yong-lan[1], BAO Han[1], ZHAO Jin-rong[1], LIANG Ping[1], LEI Xiao-ying[1], ZHANG Ju[1], YAN Zhen[1△]

(1 Fourth Military Medical University, Xi' an, 710032, P.R. China ;
2 323 Hospital of Infectious Diseases, Xi'an, 710032, P.R. China)

ABSTRACT Objective: Establish the pyrosequencing detection method of Lamivudine and Adefovir dipivoxil treatment of hepatitis B virus resistance mutations, and to provide the basis for clinical diagnosis of hepatitis B drug resistance and treatment. Methods: For gene mutation of DNA polymerase of hepatitis B virus, wild-type and mutant plasmid were constructed as a standard. The gene universal PCR primers and the point mutation pyrosequencing primer were designed by bioinformatics tools, and pyrosequencing method was established for mutation detection. The serum samples of patients were detected, who received lamivudine, adefovir dipivoxil treatment for chronic hepatitis. Results: Four common drug resistance mutations of hepatitis B virus in standard strains and mutant clone were constructed, and the pyrosequencing method of lamivudine, adefovir dipivoxil resistance mutations was established. 68 serum samples of patients with resistant or suspected drug resistance were detected and sequencing. Lamivudine resistance mutations were detected in 32 cases, adefovir resistance mutations in 5 cases, including 20 cases of pyrosequencing of mixed mutations, and Sanger sequencing showed 6 cases. Conclusion: Pyrosequencing Quantitative detection of lamivudine, adefovir dipivoxil resistance mutation method was successfully established, and the hepatitis B virus drug resistance mutations in the standard plasmid, dynamically monitor of clinical hepatitis B virus variant strains were constructed, which laid the foundation for guiding rational use of drugs.

Key words: Hepatitis B; Resistance gene; Pyrosequencing; Lamivudine; Adefovir dipivoxil
Chinese Library Classification(CLC): R512.61 R284.2 Document code: A
Article ID:1673-6273(2011)10-1873-04

前言

拉米夫定、阿德福韦酯作为乙肝治疗的一线药物,在抗病毒过程中治疗效果较好。但随着治疗时间的延长,在抗病毒治疗药物的选择性压力下,对药物敏感的野生株被抑制,而耐药株因对药物不敏感而成为优势病毒株[1]。例如服用拉米夫定治疗期间,在选择性压力下出现 DNA 聚合酶的酪氨酸 - 蛋氨酸 - 天冬氨酸 - 天冬氨酸(YMDD)基因序列变异,使其编码的 204 位蛋氨酸(M)突变为缬氨酸(V)或异亮氨酸(I),即常说的 YVDD 和 YIDD 变异[1,2]。这两种变异均导致拉米夫定与 HBV DNA

* 基金项目:"十一五"国家"艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治"科技重大专项基金资助(2009ZX10004-311),陕西省科技攻关项目(2008K09-09),西安市科技计划项目(SF0902?)资助。
作者简介:汪钦(1985-),男,在读硕士生,主要研究方向:药物基因组学,电话:13991295246,E-mail : maomao_snnu@163.com
△通讯作者:颜真,E-mail : yanzhen@fmmu.edu.cn
(收稿日期:2011-02-23 接受日期:2011-03-18)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

聚合酶的亲合力下降或消失，HBV 对其敏感性降低上千倍[3]。若不及时诊断并进行合理治疗，将导致治疗的失败。然而除了 YMDD 耐药突变的实时荧光定量 PCR 检测技术应用于临床进行定性检测之外，目前尚无比较全面和满意的定性和定量检测变异株的方法[4,5]。借助焦磷酸测序技术的发展[6]，本研究以拉米夫定(Lamivudine，LAM)和阿德福韦酯(Adefovir，ADV)的常见耐药基因突变位点即乙型肝炎病毒(HBV)聚合酶区 rtL180M[2], rtA181V/T[7], rtM204V/I[2]及 rtN236T[7]为研究靶标，建立了焦磷酸测序技术定量检测变异株的方法，动态检测变异病毒株的含量，从而为临床乙肝耐药诊断治疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病例标本 慢性乙型肝炎患者临床耐药或疑似耐药者的血清采自西安市 323 医院、西安交大二院和唐都医院共 68 例，患者患病期间服用拉米夫定、阿德福韦酯一年或一年以上[8,9]，治疗中定期进行肝功能检查、血清学检测及 HBV 定量检测并作详细记录，血清标本保存于 -20℃。

1.1.2 试剂和仪器 PCR 产物纯化及胶回收试剂盒 (Promeg 公司);天根病毒基因组提取试剂盒 (北京天根公司) ;PMD-18T 载体、DL2000 型 Marker 和 Hot start 热启动 Taq DNA 聚合酶 (Takara 公司) ; 焦磷酸测序反应试剂(Biotage 公司) ;高速离心机(Beckman 公司);PCR 扩增仪(MJ Research 公司);PSQ96 焦磷酸测序仪(Biotage 公司)。

1.2 方法

1.2.1 血清 HBV DNA 的提取 取患者血清 200μl，参照天根病毒基因组提取试剂盒说明书，提取 HBV DNA，获得病毒基因组 DNA 80μl，储存于 -20℃度备用。

1.2.2 标准质粒的构建 取病毒基因组 DNA 5 μl 为模板，以引物 Pa (5'- TGTATTCCCATCCCATCA- 3')和 Pb (5'-TGTTCCTG CGGTAAAGTA-3') 进行 PCR 扩增，DNA 测序验证后，采用 DNA 回收试剂盒(PROMEGA 公司) 纯化，而后与 pMD18-T 载体连接并转化感受态的大肠杆菌 DH 5α，接种于含有氨苄青霉素的 LB 培养皿中，37 ℃培养 16 h。每个培养皿随机挑选 6 个克隆接种于 5 ml LB 细菌培养基中进行增菌培养，提取质粒 DNA，进行 PCR 和双脱氧测序筛选。在此基础上，分别使用特异性突变引物，采用重叠延伸特异位点诱变的方法克隆各突变体。

1.2.3 焦磷酸测序 (1) 测序前 PCR 扩增：以标准质粒及患者血清 HBV DNA 为模板，以引物 P1 (5'- AGTGGGCCTCAGTC-CGTTT C-3') 和 P2 (Biotin -5'- GAACCACTGAACAAATG-GCCTA -3')；P3(5'- TAGTGCCATTTGTTCAGTGGTT -3')和 P4 (Biotin -5'- ACAGACTTGGCCCCCAATAC -3'); P5 (5'- AA-CATCTTGAGTCCCTTTTTACC -3') 和 P6 (Biotin -5'- AGCCC-CAACGTTTGGTTTTA -3') 分别扩增包含 rtL180M 和 rtA181V/T, rtM204V/I, rtN236T 突变的 DNA 片段 扩增体系：5 μl 10 x PCR buffer, 4μldNTP, 引物各 1μl, 0.25μl Hotstar Taq 酶(1.25U) , 模板 50 ng, ddH$_2$O 加至 50 μl。扩增条件：预变性 95 ℃ 5 min，变性 95℃15 s，退火 57 ℃30 s 延伸，72℃20 s，循环数 50，延伸 72℃3 min，冷却至 4℃。2%琼脂糖凝胶电泳鉴定。(2) 单链 DNA 模板制备: a. 取 40μl PCR 产物加等体积 2×binding buffer 于样品制备工具 96 孔板 A 中，并加链亲和素标记的磁珠 5μl，将 A 板放入样品制备板中，振荡 10 min。b. 用样品制备工具 (有带磁性的小棒) 把 PCR 产物轻移至含有 50μl NaOH (0.5M) 的 B 板中，振荡 1～2 min，使 PCR 产物完全释放到 NaOH 中，静置 5 min。c. 用样品制备工具将单链 DNA 移至含 100 μl 1×Annealing buffer 的 C 板中轻轻振荡 2 min 进行洗涤。d. 再将 PCR 产物移至同样含 100μl 1×Annealing buffer 的 D 板中，再次洗涤。e. 将磁珠加入到含 45μl 1×Annealing buffer 的待测板中，加入 5μl (3 μM)的测序引物，放入样品制备板中，80℃ 10 min，冷却至室温。(3)置于 PSQ96 系统并运行。

2 结果

2.1 HBV DNA 耐药突变基因标准质粒的构建及序列鉴定

从未经药物治疗的乙肝患者血清病毒 DNA 中 PCR 扩增获得 HBV DNA 聚合酶基因突变热点区域 321 bp，测序后克隆至质粒 pMD18-T 形成标准野生型基因模板。挑选克隆后，重叠延伸 PCR 法获取各突变型基因克隆，筛选突变型，测序验证，测序结果与构建的目的序列一致 (图 1) ，其中 rt180 从野生型 CTG 突变为 ATG; rt181 从野生型 GCT 突变为 ACT/GTT, rt204 从野生型 ATG 突变为 ATT/GTG; rt236 从野生型 AAC 突变为 ACC。

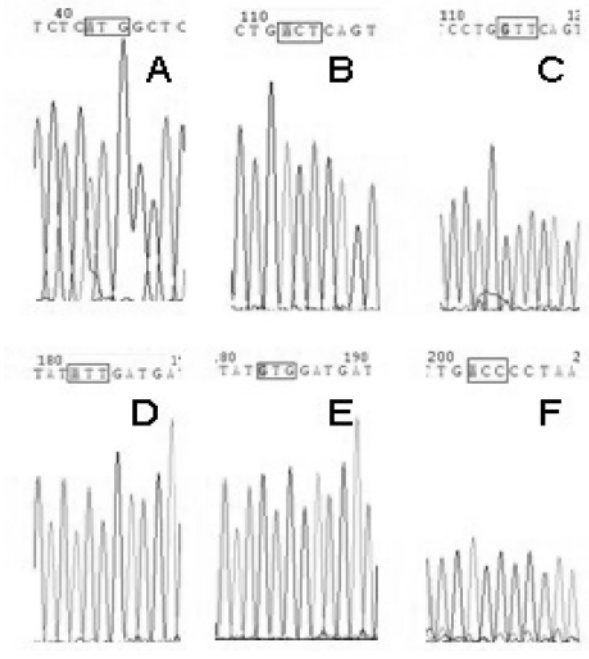

图 1 HBV DNA 耐药突变质粒的局部片段双脱氧测序图:A. rtL180M 突变；B. rtA181V 突变；C. rtA181T 突变 D. rtM204I 突变 E. rtM204V 突变 F. rtN236T 突变; 黑色框内显示突变氨基酸的编码序列

Fig. 1 Dideoxy sequencing of resistant mutant HBV DNA fragments:A. rtL180M mutation; B. rtA181V mutation; C. rtA181T mutation D. rtM204I mutation E. rtM204V mutationF. rtN236T mutation: Black box shows the coding sequence of amino acid mutations

2.2 焦磷酸测序检测变异位点

以野生型和突变型标准质粒为模板，建立焦磷酸测序检测变异位点的方法。分离纯化 PCR 扩增后的单链 DNA 产物，经过 PSQ96MA 测序检测，得到了高信噪比的野生型和 6 个突变

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

位点的焦磷酸测序结果(图 2),检测序列与双脱氧测序结果完全符合。

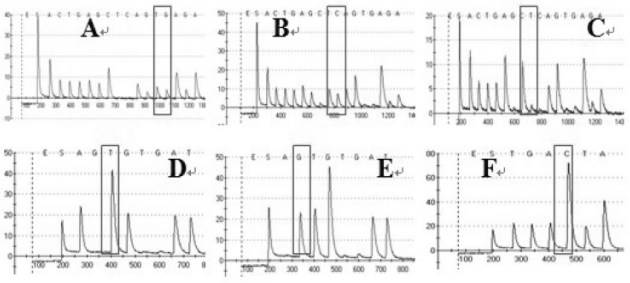

图 2 焦磷酸测序检测突变质粒图谱:A. rtL180M (TTGACTCGGTCACTCT), B. rtA181V(TTGACTCAGTCC), C. rtA181T(TTGACTTGGTCC), D. rtM204I(ATTGAT), E. rtM204V (GTGGAT), F. rtN236T(TGACCCCTAA)(下划线为突变位点)注:红色框标注为耐药突变位点

Fig. 2 Pyrosequencing to detect mutations plasmid:A. rtL180M (TTGACTCGGTCACTCT), B. rtA181V(TTGACTCAGTCC), C. rtA181T(TTGACTTGGTCC), D. rtM204I(ATTGAT), E. rtM204V (GTGGAT), F. rtN236T(TGACCCCTAA) (Underlined for the mutation - The red box labeled as resistant mutations)

2.3 经拉米夫定、阿德福韦酯治疗的患者血清样本的检测

对 68 例经拉米夫定、阿德福韦酯治疗的患者血清样本进行 4 个位点 6 种突变的检测,其中有拉米夫定治疗史的 55 例,阿德福韦酯 36 例,两种药物同时治疗的 28 例,拉米夫定治疗者的突变发生在 rtL180M 和 rtM204V/I,阿德福韦酯治疗者的突变发生在 rtA181V/T 和 rtN236T (表 1)。拉米夫定治疗组中耐药突变检出率较高,而且显示随着治疗时间的延长,变异病毒株出现的比例呈增多趋势,rtM204V/I 突变明显高于 rtL180M 突变 (表 2);阿德福韦酯治疗组病毒突变均发生在连续用药 1 年以后,检出者均为 rtA181V/T (表 3)。上述结果同时结合双脱氧测序进行对照,发现双脱氧法突变检出率较低,68 例标本中仅检出 16 例。

表 1 拉米夫定、阿德福韦酯治疗者 HBV 耐药突变检测结果:PSQ:焦磷酸测序;Sanger:双脱氧测序;n:病例数;p:突变阳性病例数

Table 1 Lamivudine, adefovir dipivoxil resistance mutations in HBV test results: PSQ: Pyrosequencing; Sanger: dideoxy sequencing; n: number of cases; p: mutation positive cases

Sequencing	LAM p/n(%)		ADV p/n(%)	
	rtL180M	rtM204V/I	rtA181V/T	rtN236T
PSQ	5/55(9)	32/55(58)	5/36(14)	0/36(0)
Sanger	1/55(2)	15/55(27)	0/36(0)	0/36(0)

表 2 拉米夫定耐药突变检测结果

Table 2 Test results of lamivudine resistance mutations

Mutation	Year=1, n=55	Year=2, n=41	Yea≥3, n=27
rtL180M p/n(%)	0/55(0)	2/41 (5)	3/27 (11)
rtM204V/I p/n(%)	14/55(25)	19/41(46)	15/27(56)

表 3 阿德福韦酯耐药突变检测结果

Table 3 Adefovir resistance mutations results

Mutation	Year=1, n=36	Year=2, n=24
rtA181V/T p/n(%)	0/36(0)	5/24(21)
rtN236T p/n(%)	0/36(0)	0/24(0)

3 讨论

我国有超过 2 千万人口的慢性乙型肝炎患者,干扰素、拉米夫定、阿德福韦酯等是目前我国治疗乙肝的重要药物,但是病毒耐药性的问题正逐渐增加,Lok AS 在 2003 年报道服用拉米夫定半年至一年约有 24%的患者产生耐药性,第二年约为 38%,第三年约为 49%,第四年约为 67%[10]。乙肝患者一旦发生耐药,将导致现有抗病毒治疗失效,病毒反弹、血清 ALT 升高、肝炎复发、疾病进展等一系列严重临床后果[11, 12]。因此耐药问题成为了影响慢性乙肝长期治疗成功与否的关键因素[13],使包括全球临床医生面临着一场挑战。

在抗病毒治疗期间和耐药性产生之前,HBV 的复制因受抑制而表现为病毒量下降,现有的检测 HBV DNA 耐药突变的方法 (包括双脱氧测序技术) 因为灵敏度不够而无法对残留的病毒进行检测,这已经成为乙肝治疗过程监测和耐药性突变检测的限速点[14]。因此,采用新技术,研发高灵敏的乙肝病毒核酸检测和耐药突变检测,具有重要的现实意义。焦磷酸测序 (pyrosequencing) 是在 DNA 合成过程中,dNTP 的渗入伴随着释放等量的 PPi,PPi 在硫酸化酶 (sulfurylase) 和荧光素酶 (luciferase) 的作用于形成光信号,残留的 dNTP 和 ATP 在荧光素酶 (apyrase) 作用下降解,按特定的顺序依次加入不同 dNTP,根据捕获的光信号确定待测位点 / 区域的序列信息[6, 15],具有快速、准确、灵敏的特点。

在实验中,PCR 产物的质量是检测结果的好坏的决定因素,通过实验条件的优化,本研究摸索到采用 HPLC 方法合成的 PCR 引物,其测序检测结果要优于其他方法引物合成的结果。同时为了使含有生物素标记的引物在 PCR 反应中消耗掉以减少剩余引物对焦磷酸测序检测反应的非特异影响,通过增加 PCR 反应循环数达到了较好的结果。在对 55 例拉米夫定耐药标本的检测中,焦磷酸测序检出 37 例,而双脱氧测序仅检出 16 例,充分显示了本研究建立方法的敏感性和特异性。

通过建立焦磷酸测序检测乙肝耐药基因的变异的方法,为临床开展乙肝的个体化治疗提供依据,对出现临床耐药能够进行动态检测。结合临床资料进行分析,拉米夫定治疗组耐药突变率与 Lok AS 的研究结果一致[10],但阿德福韦酯治疗组则与 Borroto-Esoda[16-18]不一致,在所检测样本里仅出现 5 例,且在出现临床耐药 (病毒拷贝数和 ALT 升高) 后,并未出现其相关基因型耐药[19]。基因型耐药发生后,发生的病毒学反跳与 ALT 的升高在时间上不尽一致,提示可能与其他因素有关。

通过对本实验室收集的临床样本检测结果,根据患者用药情况,得出拉米夫定治疗组耐药发生率较高,其中 rtM204V/I (即 YMDD) 耐药发生最普遍。而阿德福韦酯治疗组耐药发生率较低,其中 rtN236T 没有检出,显示出现在患者出现临床耐药后,并未出现完全相关的基因型耐药,可能与患者自身免疫

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

水平或其他未知因素相关，需进一步研究[20]。在所检测样本中，经拉米夫定、阿德福韦酯联合用药组患者其 DNA 拷贝数、ALT 在正常数值范围内，有良好的治疗效果。

参考文献(Reference)

[1] Ghany M, Liang TJ. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B [J]. Gastroenterology, 2007, 132(4): 1574-1585

[2] Allen MI, Deslauriers M ,Andrews CW, et al. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group [J]. Hepatology, 1998, 27(6): 1670-1677

[3] Zoulim F. Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection [J]. Antiviral Res, 2004, 64(1): 1-15

[4] Kim HS, Han KH, Ahn SH, et al. Evaluation of methods for monitoring drug resistance in chronic hepatitis B patients during lamivudine therapy based on mass spectrometry and reverse hybridization [J]. Antivir Ther, 2005, 10(3): 441-449

[5] Liu YC, Zhang WL, Hu Y, et al. Detection of HBV resistant mutations related to lamivudine, adefovir and entecavir by reverse hybridization technique [J]. Chinese J Hepatol, 2010, 18(6): 414-418

[6] Fakhrai RH, Pourmand N, Ronaghi M . Pyrosequencing: an accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms [J]. Hum Mutat, 2002, 19(5): 479-485

[7] Zoulim F. Antiviral therapy of chronic hepatitis B: can we clear the virus and prevent drug resistance? [J] Antivir Chem Chemother, 2004, 15(6): 299-305

[8] Chen EQ, Wang LC, Lei J, et al. Meta-analysis: adefovir dipivoxil in combination with lamivudine in patients with lamivudine-resistant hepatitis B virus [J]. Virol J, 2009, 6: 163

[9] Cho SW, Cho YJ, Cheong JY, et al. Add on lamivudine to adefovir monotherapy for the treatment of lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients [J]. Korean J Gastroenterol, 2010, 56(2): 83-89

[10] Lok AS, Lai CL, Leung N, et al. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B [J]. Gastroenterology, 2003, 125(6): 1714-1722

[11] Zoulim F, Durantel D, Deny P. Management and prevention of drug resistance in chronic hepatitis B[J]. Liver Int, 2009, 29,1: 108-115

[12] Zhang DZ. Drug resistance in the patients with chronic hepatitis B: prevention and treatment [J]. Chinese J Hepatol, 2007, 15(1): 57-58

[13] Fournier C, Zoulim F. Antiviral therapy of chronic hepatitis B: prevention of drug resistance [J]. Clin Liver Dis, 2007, 11(4): 869-892

[14] Shin SR, Koh KC, Gwak GY, et al. A low viral load predicts a higher initial virologic response to adefovir in patients with Lamivudine-resistant chronic hepatitis B[J]. Gut Liver, 2010, 4(4): 530-536

[15] Tian GB, Xi HL, Tian D ,et al. Dynamics of hepatitis B virus variations during lamivudine treatment [J]. World Chinese J Digestol, 2007, 15(30): 3245-3250

[16] Lee JM, Park JY, Kim DoY, et al. Long-term adefovir dipivoxil monotherapy for up to 5 years in lamivudine-resistant chronic hepatitis B [J]. Antivir Ther, 2010, 15(2): 235-241

[17] Borroto-Esoda K, Zoulim F，Arterburn S, et al . Final Analysis of Virological Outcomes and Resistance During 5 Years of Adefovir Dipivoxil Monotherapy in BeAg-Negative Patients [J]. J Hepatol, 2006;44 (suppl 2):S179-80 (Poster 483)

[18] Chen CH, Wang JH, Lu SN, et al. Characteristics of adefovir resistance in patients with or without lamivudine-resistant hepatitis B virus treated with adefovir: a 4-year experience [J]. Liver Int, 2011, 31(2): 206-214

[19] Ikeda F, Kobashi H , Yamamoto K. Treatment of patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B[J]. Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi, 2011, 108(2): 196-201

[20] Santantonio T, Fasano M, Durantel S, et al. Adefovir dipivoxil resistance patterns in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B [J]. Antivir Ther, 2009, 14(4): 557-565

（上接第 1854 页）

[10] Wollina U, Hansel G, Kr?nert C, Heinig B.Using VAC to facilitate healing of traumatic wounds in patients with chronic lymphoedema. J Wound Care. 2010 Jan;19(1):15-17

[11] 李望舟，李金清，李学拥，等. VAC 对猪爆炸伤感染创面细菌数和 G+/G- 比例的影响[J]. 第四军医大学学报,2007,28(4) :321-323
LI wang-zhou, LI jin-qing, Ll xue-yong et al, Effect of vacuum-assisted closure on bacteria load and G+ to G- bacteria ratio in pig's infected soft tissue blast injury[J]. (J Fourth Mil Med Univ), 2007,28(4):321-323

[12] Banwell PE, Musgrave M. Topical negative pressure therapy: mechanisms and indications. [J] Int Wound J, 2004 Jun;1(2):95-106

[13] 陈绍宗，李金清，李跃军.封闭负压引流技术减少爆炸伤创面坏死及促进愈合的实验研究[J].中华创伤杂志,2007,23(7):542-545
CHEN shao-zong, LI jin-qing, LI yue-jun Effects of vacuum-assisted closure on decreasing tissue necrosis and promoting wound healing after blast injury [J]. Chin J Trauma, July 2007 Vo1.23,NO.7: 542-545

[14] Mooney JF, Argenta LC, Marks MW, et al, Treatment of soft tissue defects in pediatric patients using the VAC system [J]. Clin Orthop, 2000, 376:26-31

[15] Finn Gottrup. Oxygen in Wound Healing and Infection World [J]. Surg, 2004,28, 312-315

[16] Chandan K. Sen, PhD Wound healing essentials: Let there be oxygen. [J] Wound Rep Reg 2009, (17):1-18

[17] Moris T, Orly B, Moni L, et al Application of regulated oxygen-enriched negative pressure-assisted wound therapy in combating anaerobic infections[J]. Eur J Plast Surg, published online 21 October 2010

[18] Gordillo GM, Sen CK. Revisiting the essential role of oxygen in wound healing[J]. Am J Surg, 2003, 186: 259-263

[19] Patel V, Chivukala I, Roy S. et al. Oxygen: from the benefits of inducing VEGF expression to managing the risk of hyperbaric stress [J]. Antioxid Redox Signal, 2005, 7: 9-10, 1377-1387

[20] Heng MCY. Topical Hyperbaric therapy for preblem skin wounds. [J] J Dermatol Surg Oncol, 1993,19(8):784-793

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net