

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.06.001

• 基础研究 •

基于 PI3K/PTEN/AKT 信号途径探讨褪黑素
对脊髓损伤大鼠突触可塑性的影响 *毕佳琦^{1,3} 陈 崇¹ 李 政¹ 孙佩宇² 谭海宁¹ 林友禧¹ 沈建雄^{1Δ}

(1 中国医学科学院 清华大学医学部 - 北京协和医院骨一科 北京 100730;

2 首都医科大学附属北京中医医院骨科 北京 100010; 3 哈尔滨市第一医院 黑龙江 哈尔滨 150010)

摘要目的: 探讨褪黑素对脊髓损伤大鼠突触可塑性的影响及磷脂酰肌醇 3- 激酶 / 张力蛋白同源基因 / 蛋白激酶 B (PI3K/PTEN/AKT)信号途径在其中的作用。**方法:** 选择 4 月龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只, 将其随机分为对照组(CON)、模型组(SCI)、褪黑素组(MT)和褪黑素受体拮抗剂组(LUZ), 每组 12 只大鼠。对照组大鼠背部切口后缝合, 余下各组大鼠使用改良的 Allen's 法建立 T₉ 水平的脊髓损伤模型。模型建立后, 褪黑素组及褪黑素受体拮抗剂组每天腹腔注射褪黑素及褪黑素抑制剂, 剂量为 12.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 对照组和模型组每天注射同体积的生理盐水。治疗后第 3、7、14、21、28 天进行 BBB 评分, 实验结束处死大鼠取胸椎 8-10 节段脊髓组织, 分别采用免疫组化方法测尼氏小体数量及 Western Blot 检测 PTEN、Synapsin、PSD-95、Gap-43、Akt 蛋白的表达。**结果:** 与 SCI 模型大鼠相比, MT 给药干预 14 d 后的 SCI 大鼠 BBB 评分及痛觉压力值均明显降低($P<0.05$), 尼氏小体灰度值提高 ($P<0.05$), PTEN、Synapsin、PSD-95、Gap-43、Akt 蛋白的表达均显著上调 ($P<0.05$)。**结论:** MT 可能通过激活 PI3K/PTEN/Akt 信号途径, 上调突触可塑性相关蛋白的表达, 促进 SCI 大鼠突触修复。

关键词: 脊髓损伤; 褪黑素; PI3K**中图分类号:** R-33; R651.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)06-1001-05Effect of Melatonin on Synaptic Plasticity in Rats with Spinal Cord Injury
Based on PI3K/PTEN/AKT Signaling Pathway*BI Jia-qí^{1,3}, CHEN Chong¹, LI Zheng¹, SUN Pei-yu², TAN Hai-ning¹, LIN You-xi¹, SHEN Jian-xiong^{1Δ}

(1 Department of Orthopedics, Peking Union Medical College Hospital, Beijing, 100730, China; 2 Department of Orthopedics, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Beijing, 100010, China; 3 The first hospital of Harbin, Harbin, Heilongjiang, 150010, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of melatonin on synaptic plasticity in rats with spinal cord injury and the role of PI3K/PTEN/AKT signaling pathway. **Methods:** Forty-eight SPF male Sprague-Dawley rats aged 4 months were randomly divided into control group (CON), model group (SCI), melatonin group (MT) and the melatonin receptor antagonist group (LUZ), 12 in each group. Rats in the control group were sutured after the incision, and the remaining groups of rats were used to establish a T₉ level spinal cord injury model using the modified Allen's method. After the model was established, the rats in MT and LUZ were intraperitoneally injected with melatonin and melatonin inhibitor at a dose of 12.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹. Rats in CON and the SCI were injected with the same volume of physiological saline daily. BBB scores were performed on the 3rd, 7th, 14th, 21st, and 28th day after treatment. At the end of the experiment, the rats were sacrificed and the spinal cord tissue of 8-10 segments was taken. The number of Nissl bodies and expression of Synapsin, PSD-95, Gap-43, Akt protein, were detected by immunohistochemistry and Western Blot. **Results:** After 14 days of MT administration, the BBB score of SCI rats could be significantly reduced, the pain pressure value could be reduced, the gray value of Nissl bodies increased, and the expression of PTEN, Synapsin, PSD-95, Gap-43 and Akt protein could be up-regulated. **Conclusion:** MT may up-regulate the expression of synaptic plasticity-related proteins by activating the PI3K/PTEN/Akt signaling pathway and promote synaptic repair in SCI rats.

Key words: Spinal cord injury; Melatonin; PI3K**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R651.2 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2019)06-1001-05

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81330044, 81772424)

作者简介: 毕佳琦(1982-), 男, 博士研究生, 主要研究方向: 神经损伤与临床治疗, E-mail: bijq218@163.com

Δ 通讯作者: 沈建雄(1960-), 男, 教授, 博士生导师, 主要研究方向: 脊柱侧弯, E-mail: sjxpumch@yahoo.com

(收稿日期: 2018-10-22 接受日期: 2018-11-17)

前言

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)可导致运动和感觉功能的缺陷,带来患者沉重的生理及心理负担,在世界范围内的发病率约为180000/年,且随着交通工业发展仍在继续增高,但目前仍没有十分有效的治疗手段^[1,2]。褪黑素是从松果体分泌的一种吲哚类神经内分泌激素,其生理效应包含了生物钟、繁殖、免疫、消化、中枢神经系统等方面,已经被用于治疗失眠、癌症、心血管疾病、衰老等^[3-5]。最近的研究表明褪黑素修复损伤的突触可塑性可能是其改善运动功能的原因,但是相关机制仍不完全明确^[6,7]。

PI3K/PTEN/Akt 信号转导通路具有调节细胞分化、增殖及抑制细胞凋亡的作用^[8-10]。在 SCI 发生后,PI3K/PTEN/Akt 信号转导通路的激活抑制细胞凋亡,还能够上调包括巢蛋白、神经元特异性烯醇化酶、神经丝蛋白-200(NF-200)等在内的众多与神经元再生有关的蛋白质的表达,促进突触的修复^[11]。本研究主要探讨了褪黑素对大鼠脊髓损伤的保护作用及其用于修复突触可塑性的效果,以期褪黑素的临床应用提供理论支持。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

SPF 级雄性 Sprague-Dawley 大鼠 48 只(许可证号:SCXK(京)2016-0002),4 月龄,体重 240-260 克,购于北京斯贝福生物技术有限公司。褪黑素,褪黑素受体拮抗剂 Luzindole(Sigma 公司)。兔抗鼠 GAPDH 抗体 (Servicebio 公司);Gap-43、Synapsin 抗体(Abcam 公司);PSD-95、AKT、PTEN 抗体(Affinity 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组及模型建立 依随机数字表法将大鼠分为 CON 组、SCI 组、MT 组和 LUZ 组。CON 组以外的大鼠采用改良 Allen's 打击装置制作 SCI 模型。具体操作为大鼠水合氯醛 30 mg·kg⁻¹ 腹腔注射麻醉,俯卧位固定,备皮,常规消毒,以 T₉ 为中心行后正中中线纵行切口,显露 T₈₋₁₀ 棘突及椎板,生理盐水冲洗后切除 T₉ 椎板,以脊髓后正中血管为中心,10 g 打击棒自 25 mm 高自由落下撞击 T₉ 脊髓,并压迫脊髓 1 min,大鼠损伤平面以下完全瘫痪为模型成功标志^[12]。术毕用青霉素盐水冲洗伤口,逐层缝合组织。早中晚各按压膀胱排尿 1 次,直至恢复排尿反射。

造模成功后,MT 组及 LUZ 组每天腹腔注射褪黑素及褪黑

素抑制剂,剂量为 12.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹,CON 组、SCI 组于治疗时间腹腔注射 1%乙醇生理盐水溶液 1 mL。治疗时间为每日天 18-20 时。

1.2.2 BBB 评分及痛觉测试 治疗后第 3、7、14、21、28 天进行 BBB 评分,利用 YLS-3E 电子压痛仪进行鼠尾痛觉测试^[12,13]。

1.2.3 尼氏体染色 每组取 6 只大鼠麻醉后,4%多聚甲醛灌注,取出脊髓,甲醛中固定 4 h。冰冻切片片机切片,二甲苯及梯度乙醇脱水,苏木素-伊红染色 30 min,蒸馏水清洗,70%乙醇分色 3 min。70%乙醇、80%乙醇、95%乙醇,各 2 min 脱水,中性树胶封片,显微镜下观察,拍照。使用 Image J 软件分析尼氏小体灰度值。

1.2.4 Western blotting 以打击点为中心取脊髓组织 1 cm,剪碎后加裂解液冰浴 20 min,14000×g 离心 15 min,BCA 法进行蛋白定量后,加裂解液稀释至统一浓度,加入 loading buffer 后沸水浴 10 min。100 V 恒压预制凝胶电泳分离,150 mA,120 min 转至 PVDF 膜,加 Gap-43、Synapsin、PSD-95、Akt、PTEN 抗体 (1:500-1:2000),结合上含有辣根过氧化酶的抗兔 IgG(1:4000),ECL 显色。Tanon 5200 化学发光成像系统获取图像后使用 Image J 软件进行蛋白条带的灰度值分析。

1.3 统计学方法

采用统计学软件 SPSS23.0 对统计数据进行分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 褪黑素改善 SCI 大鼠的感觉及运动功能

MT 给药干预 14 d 后,SCI 大鼠 BBB 评分明显升高,而痛觉压力数值降低,与 SCI 组比较差异具有显著性意义($P < 0.01$)。给予 LUZ 的大鼠运动和感觉功能的恢复明显抑制,7 d 和 14 d 后,大鼠的 BBB 评分降低及压痛值明显高于 SCI 组,差异具有显著性意义($P < 0.01$)。

2.2 褪黑素增加尼氏小体灰度值

MT 可以提高 SCI 模型大鼠脊髓尼氏小体灰度值,与 SCI 组比较差异具有显著性意义($P < 0.01$)。

2.3 MT 对 SCI 大鼠脊髓组织 PI3K/PTEN/Akt 信号途径蛋白表达的影响

MT 可显著增加 SCI 模型大鼠脊髓组织 AKT 及下游 Synapsin、PSD-95、Gap-43、PTEN 蛋白的表达($P < 0.01$),而加入

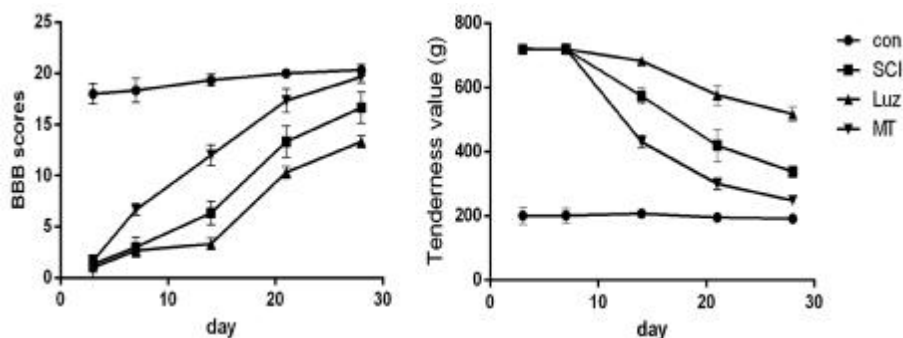


图 1 各组大鼠 BBB 评分及压痛值测定情况

Fig.1 Determination of BBB score and tenderness value of rats in each group

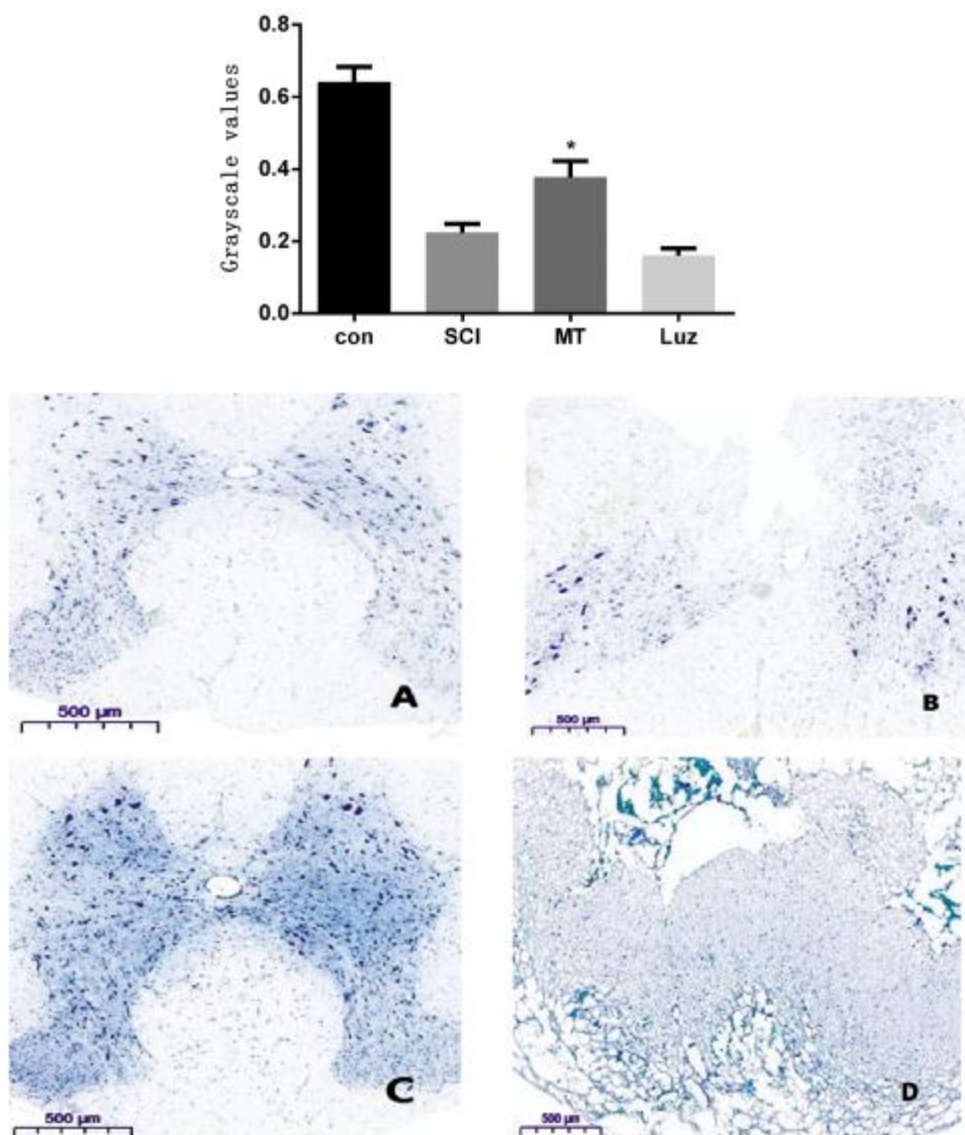


图2 各组大鼠脊髓尼氏小体染色情况比较

(A: con, B: SCI, C: MT, D: Luz)

Fig.2 Comparison of the staining of Nissl bodies in the spinal cord of rats in each group

注:* 与 SCI 组比较, $P < 0.01$ 。Note:* compared with SCI group, $P < 0.01$.

LUZ 后,蛋白表达上调的趋势被阻断。

3 讨论

脊髓由包含神经细胞的上行及下行传导束所构成的灰质和白质组成。当出现完全性脊髓实质横贯损伤时,脊髓损伤的最低位椎体平面的感觉、运动功能完全丧失,包括膀胱、肛门括约肌的收缩运动功能丧失^[4]。在脊髓损伤发生 3 小时后,灰质内出现多发出血灶,此时白质未出现病理改变;随着时间推移,灰质内出血灶逐渐增多,白质逐渐水肿加重;损伤发生 12 小时后,灰质神经元胞体开始出现不同位置及不同程度地脊髓损伤会引起迥异的临床表现,从感觉和 / 或运动功能的部分丧失到损伤部位以下的完全瘫痪,并产生一系列相关的早期或晚期并发症^[15,16]。脊髓损伤其预后与损伤后脊髓微弱的再生能力有关。脊髓损伤发生后,脊髓神经元的原发性损伤和继发性损伤是引起脊髓神经功能障碍的主要原因,其包括细胞坏死、轴突崩解

和脱髓鞘改变、胶质瘢痕形成、炎症反应以及其他复杂的病理生理变化^[17-19]。

大鼠 T₁₀ 水平损伤可导致严重脊髓横贯性损伤,而致伤暴力主要集中在背侧,与大鼠运动功能丧失密切相关。BBB 评分中 0 表示完全瘫痪,21 表示正常运动功能,本实验中 MT 组得分于 14 d 后均较明显高于 SCI 组,且明显降低痛觉测试中压痛值水平,BBB 评分及痛觉测试均提示大鼠的神经功能和神经可塑性进入缓慢的自愈过程。

神经细胞元及神经胶质细胞共同构成神经组织。虽然神经元是呈现多种形态,但其组成是统一的:胞体、树突和轴突。胞体是神经元的营养和代谢中心,包括细胞核和细胞质^[24,25]。细胞质在光镜下的特征结构为尼氏体和神经原纤维。尼氏体的主要功能是合成与神经递质有关的蛋白质和酶^[26]。大鼠脊髓损伤后经连续腹腔注射褪黑素后,我们观察到在尼氏小体灰度值明显增加的同时,后面与突触可塑性相关的蛋白表达量也相应的增

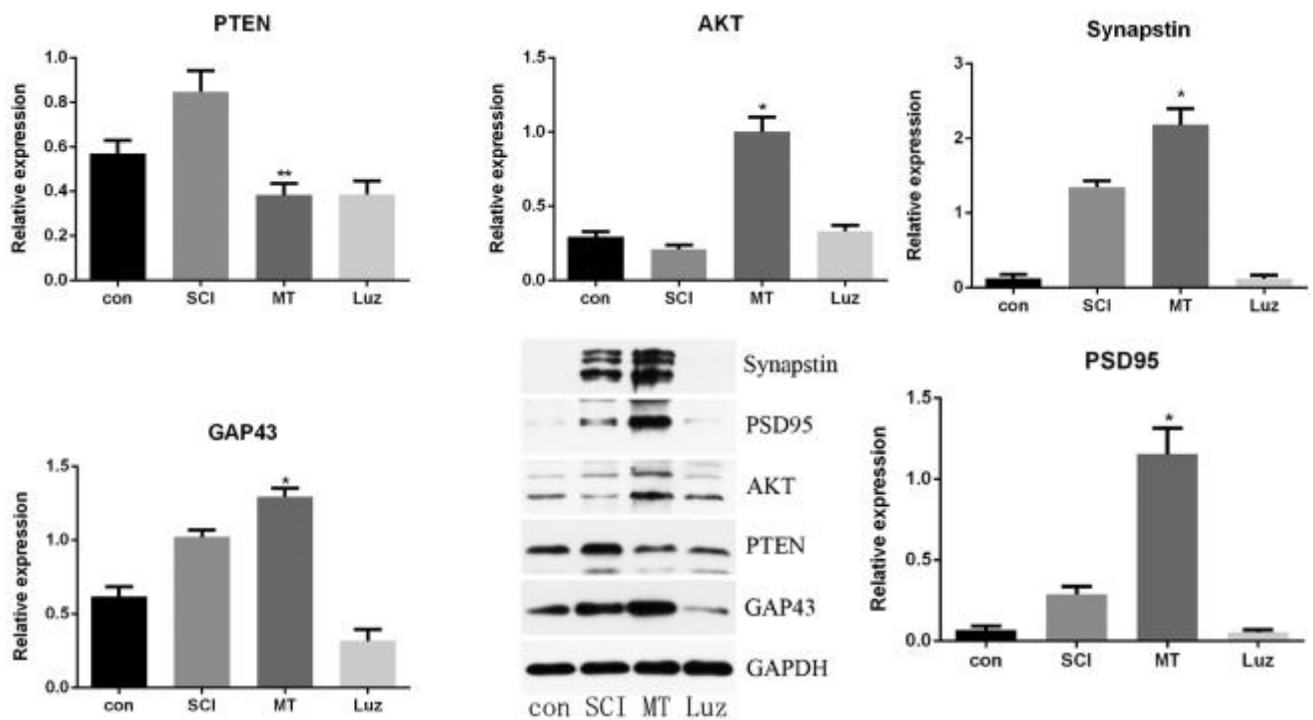


图3 MT 激活 PI3K/PTEN/Akt 信号途径增加突触修复蛋白的表达

Fig.3 MT activates PI3K/ PTEN/Akt signaling pathway and increases the expression of synaptic repair protein

注:* 与 SCI 组比较, $P < 0.01$ 。

Note:* compare to SCI group, $P < 0.01$.

高,表明褪黑素可以促进 SCI 大鼠突触可塑性的恢复。

GAP-43 是一种脊椎动物神经细胞膜上的特异性磷蛋白,被认为是研究神经生长发育和损伤修复等神经可塑性的首选分子探针^[27]。神经原纤维交错排列成网,并伸入树突及轴突中^[28]。NF-200 是轴突细胞骨架的主要成分,可以诱导损伤轴突延长和重构,是神经元纤维的重要组成。Synapsin、PSD-95 则是促进神经元分化和脊髓发育的重要蛋白^[29,30]。synapsin 蛋白是一类在进化中高度保守与突触囊泡外侧相连的磷蛋白。通过基因重组的小鼠及生理学的观察,学者们发现 synapsin 在神经递质释放及突触可塑性等生理活动过程中具有重要作用^[31]。PI3K-PTEN-AKT 信号通路是经典抑制细胞凋亡启动通路。PI3K 信号通路的激活需要细胞膜上 PIP2(磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸)向 PIP3(磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸)转化,AKT 是 PI3K 的一个主要的下游蛋白,能介导多种生物学效应,是重要的抗凋亡调节因子。PIP3 与细胞内 Pleckstrin Homology 结构域结合导致 AKT 活化^[30,21]。PTEN 是 PI3K-AKT 通路的主要抑制剂,PTEN 抑制了 PIP2 向 PIP3 的转化,所以 PTEN 对神经元轴突的恢复起到抑制作用。在我们的研究中,通过 Western blot 对 MT 组及其各对照组的观察,发现褪黑素降低 PTEN 表达,上调了 AKT 水平促进轴突生长。褪黑素受体(MT1 和 MT2)存在于脊髓背角、腹角及神经元内,受体被褪黑素激活后,调节神经元存活及神经干细胞分化等^[22,23]。本实验中,我们通过组成神经细胞的三部分所包含的关键蛋白和信号通路对我们提出的假设进行验证。在大鼠的运动和感觉功能观察中,MT 组的大鼠相比较于 SCI 组更早的恢复。尼氏体反应的是胞体内环境,通观察尼氏体发现 MT 组出现了比 CON 组更多的尼氏体,而 LUZ 组中几乎消失。PI3K-PTEN-AKT 信号通路的激活在抑制

神经细胞凋亡的同时升高相关的蛋白。PTEN 阻止 PIP2 向 PIP3 转化是在细胞膜上进行,MT 组 GAP-43 和 NF-200 的升高可以保证转化场所的完整性,细胞膜的不完整及 PIP3 的缺乏均不能磷酸化 AKT。Synapsin 和 PSD-95 蛋白升高增加了神经细胞间信息的传递,这与实验中各组大鼠运动和感觉的恢复相吻合。

综上所述,褪黑素可能通过激活 PI3K/PTEN/Akt 信号途径,上调突触可塑性相关蛋白的表达,减轻脊髓神经元的损伤。

参考文献(References)

- [1] Park K, Lee Y, Park S, et al. Synergistic effect of melatonin on exercise induced neuronal reconstruction and functional recovery in a spinal cord injury animal model[J]. Journal of Pineal Research, 2010, 48(3): 270-281
- [2] Venkataraman P, Selvakumar K, Krishnamoorthy G, et al. Effect of melatonin on PCB (Aroclor 1254) induced neuronal damage and changes in Cu/Zn superoxide dismutase and glutathione peroxidase-4 mRNA expression in cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of adult rats[J]. Neuroscience Research, 2010, 66(2): 189-197
- [3] 唐蛟,沈达勇,周苏,等.褪黑素对脑梗死的保护作用及研究进展[J].现代生物医学进展,2017,17(17): 3397-3400
- [4] He R, Cui M, Lin H, et al. Melatonin resists oxidative stress-induced apoptosis in nucleus pulposus cells [J]. Life Sciences, 2018, 199: 122-130
- [5] Slominski AT, Hardeland R, Zmijewski MA, et al. Melatonin: A Cutaneous Perspective on its Production, Metabolism, and Functions [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2018, 138(3): 490-499
- [6] 荆藏黎,刘小野,白帆,等.褪黑素对脊髓损伤大鼠突触可塑性的作用[J].中国康复理论与实践,2016,22(7): 774-778

- [7] Zhao H, Chen S, Gao K, et al. Resveratrol protects against spinal cord injury by activating autophagy and inhibiting apoptosis mediated by the SIRT1/AMPK signaling pathway [J]. *Neuroscience*, 2017, 348: 241-251
- [8] Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt Pathway[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2012, 4(9): a011189
- [9] Jung SY, Kim DY, Yune TY, et al. Treadmill exercise reduces spinal cord injury-induced apoptosis by activating the PI3K/Akt pathway in rats[J]. *Experimental & Therapeutic Medicine*, 2014, 7(3): 587-593
- [10] Zhang P, Zhang L, Zhu L, et al. The change tendency of PI3K/Akt pathway after spinal cord injury[J]. *American Journal of Translational Research*, 2015, 7(11): 2223
- [11] 刘杨, 苗宇船. 大鼠脊髓损伤早期 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路的活性改变及其与后肢运动功能恢复的关系[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2015, 35(6): 804-808
- [12] Lee Y, Lee S, Lee SR, et al. Beneficial Effects of Melatonin Combined with Exercise on Endogenous Neural Stem/Progenitor Cells Proliferation after Spinal Cord Injury[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(2): 2207-2222
- [13] 舒海华, 李桥波, 叶芳, 等. 环氧合酶-2 抑制剂帕瑞昔布对急性芬太尼诱导的大鼠痛觉过敏的抑制作用[J]. *实用医学杂志*, 2015(5): 711-714
- [14] Schuld C, Franz S, Brüggemann K, et al. International standards for neurological classification of spinal cord injury: impact of the revised worksheet (revision 02/13) on classification performance[J]. *Journal of the American Paraplegia Society*, 2016, 39(5): 504-512
- [15] Hutchins GM, Meuli M, Meuli-Simmen C, et al. Acquired spinal cord injury in human fetuses with myelomeningocele [J]. *Pediatric Pathology*, 2016, 16(5): 701-712
- [16] McDonald JW, Sadowsky C. Spinal-cord injury[J]. *Lancet*, 2002, 359 (9304): 417-425
- [17] 刘杨, 高玉亭, 苗宇船. 丹参注射液对大鼠脊髓损伤后 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路活性及后肢运动功能的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017(14): 152-157
- [18] Beattie MS, Farooqui AA, Bresnahan J C. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury [J]. *Journal of Neurotrauma*, 2000, 17(10): 915
- [19] Wang S, Liu Y, Wu C, et al. The Expression of IGFBP6 after Spinal Cord Injury: Implications for Neuronal Apoptosis [J]. *Neurochemical Research*, 2016, 42(2): 1-13
- [20] 王晓英, 张均田. 突触可塑性及相关蛋白研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2001, 17(4): 369-372
- [21] Porseva VV, Korzina MB, Smirnova VP, et al. Developmental Changes in NF-200 Neurons in Sensory Ganglia at Different Segmental Levels on Chemical Deafferentation [J]. *Neuroscience & Behavioral Physiology*, 2013, 43(5): 602-606
- [22] Kong X, Li X, Cai Z, et al. Melatonin regulates the viability and differentiation of rat midbrain neural stem cells [J]. *Cellular & Molecular Neurobiology*, 2008, 28(4): 569-579
- [23] Jenwitheesuk A, Nopparat C, Mukda S, et al. Melatonin regulates aging and neurodegeneration through energy metabolism, epigenetics, autophagy and circadian rhythm pathways[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(9): 16848-16884
- [24] Guo Y, Wang F, Li H, et al. Metformin Protects Against Spinal Cord Injury by Regulating Autophagy via the mTOR Signaling Pathway[J]. *Neurochemical Research*, 2018, 43(5): 1111-1117
- [25] Zhao BB, Long QH, Wang CY, et al. Protective Effects of Liu Wei Di Huang Wan on the Liver, Orbitofrontal Cortex Nissl Bodies, and Neurites in MSG+PH-Induced Liver Regeneration Rat Model [J]. 2018[Epub ahead of print]
- [26] Li J, Wen P Y, Li WW, et al. Upregulation effects of Tanshinone IIA on the expressions of NeuN, Nissl body, and I κ B and downregulation effects on the expressions of GFAP and NF- κ B in the brain tissues of rat models of Alzheimer's disease[J]. *Neuroreport*, 2015, 26(13): 758-766
- [27] Caprini M, Gomis A, Cabedo H, et al. GAP43 stimulates inositol trisphosphate-mediated calcium release in response to hypotonicity [J]. *Embo Journal*, 2014, 22(12): 3004-3014
- [28] Biffo S, Verhaagen J, Schrama LH, et al. B-50/GAP43 Expression Correlates with Process Outgrowth in the Embryonic Mouse Nervous System[J]. *European Journal of Neuroscience*, 2010, 2(6): 487-499
- [29] Chi P, Greengard P, Ryan TA. Synapsin dispersion and recluster during synaptic activity[J]. *Nature Neuroscience*, 2001, 4(12): 1187-1193
- [30] Barbieri R, Contestabile A, Ciardo MG, et al. Synapsin I and Synapsin II regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(27): 18760-18774
- [31] Tu Y, Nayak SK, Woodson J, et al. Phosphorylation-regulated inhibition of the Gz GTPase-activating protein activity of RGS proteins by synapsin I [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278 (52): 52273-52281

(上接第 1094 页)

- [24] Wang CT, Zhang YF, Sun BH, et al. Models for predicting hepatitis B e antigen seroconversion in response to interferon- α in chronic hepatitis B patients[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(18): 5668-5676
- [25] Zhuang H. Updates of EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection[J]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2012, 20(6): 427-429
- [26] Qi X. Peginterferon Alfa-2a, Lamivudine, and the Combination for HBeAg-Positive Chronic Hepatitis B [J]. *N Engl J Med*, 2015, 352 (26): 2682-2695
- [27] Marcellin P, Bonino F, Lau GK, et al. Sustained response of hepatitis

B e antigen-negative patients 3 years after treatment with peginterferon alpha-2a[J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(7): 2169-2179

- [28] Hadziyannis SJ, Sevdastianos V, Rapti I, et al. Sustained responses and loss of HBsAg in HBeAg-negative patients with chronic hepatitis B who stop long-term treatment with adefovir [J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(3): 629-636
- [29] Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, et al. Clearance of hepatitis B surface antigen during long-term nucleot (s)ide analog treatment in chronic hepatitis B: results from a nine-year longitudinal study [J]. *J Gastroenterol*, 2013, 48(8): 930-941