

HBV cccDNA检测方法及其研究意义

杨培, 秦波

杨培, 秦波, 重庆医科大学附属第二医院感染病科 重庆市 400010
重庆市卫生局重点科研课题资助项目, No. 渝卫科教(2005) 31号(05-1-001)
通讯作者: 秦波, 400010, 重庆市, 重庆医科大学附属第二医院 感染病科. cqjinbo@126.com
电话: 023-63717934
收稿日期: 2006-01-27 接受日期: 2006-02-13

摘要

HBV cccDNA是HBV mRNA和前基因组RNA的合成模板, 是HBV持续感染的关键因素, 检测HBV cccDNA对进一步认识HBV生活周期及指导抗病毒治疗等有重要意义. 最近, 利用PCR方法检测HBV cccDNA受到越来越多的重视, 现就检测HBV cccDNA的各种PCR方法及其研究意义进行综述.

关键词: 肝炎病毒; 乙型; 共价闭合环状DNA; 聚合酶链反应

杨培, 秦波. HBV cccDNA检测方法及其研究意义. 世界华人消化杂志. 2006;14(20):1999-2002
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1999.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒共价闭合环状DNA(hepatitis B virus covalently closed circular DNA, HBV cccDNA)是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)复制的中间体, 是HBV mRNA和前基因组RNA的合成模板, 同时也是HBV持续感染的关键因素^[1-2]. Southern blot是检测HBV cccDNA的经典方法, 其过程较复杂, 操作可控性差, 且灵敏度不高. 随着聚合酶链反应(PCR)技术不断发展和完善, 检测HBV cccDNA已成为可能, 并已取得了许多重要进展.

1 检测cccDNA的意义

1.1 认识和掌握HBV生活周期 在HBV生活周期中, HBV cccDNA的形成是关键一步. 以HBV cccDNA为模板合成的前基因组RNA在核内转录后转运至胞质, 经组装进入由病毒核心蛋白及P蛋白组成的复合体内, 逆转录合成HBV

DNA负链. 前基因组RNA继而被降解, 剩下负链作为模板合成正链DNA, 新合成的HBV rcDNA中正链大多不完整. 含有此种HBV rcDNA的核衣壳可以包装进病毒包膜, 转运出细胞成为成熟的病毒颗粒; 也可在胞质内脱壳, 转运至核内, 补充HBV cccDNA的量. 通过包膜蛋白的反馈抑制作用及肝细胞周期的循环等机制, 使HBV cccDNA在被感染的肝细胞内保持一定水平, 形成一个HBV cccDNA池^[3-4].

1.2 指导乙型肝炎抗病毒治疗 最近研究表明^[5], HBV cccDNA与细胞核内的核蛋白结合形成微染色体, 嗜肝病毒的不对称复制可保护HBV cccDNA不被链终止多聚酶抑制物直接清除, 并且病毒处于低复制状态时成熟的病毒体优先用于补充HBV cccDNA池, 如此多种因素的共同作用可使抗病毒药物对HBV cccDNA无直接抑制作用. HBV cccDNA持续存在于肝细胞内, 而造成HBV的持续感染和抗病毒药物治疗后的HBV再复制. Sung *et al*^[6]在用拉米夫定单一治疗或联合长效干扰素治疗中发现, 持续应答患者肝细胞内HBV cccDNA明显较无应答患者低, 在预测治疗后持续病原学应答方面优于血清HBV DNA. 郭皓宇 *et al*^[7]对17例慢性乙型肝炎患者行48 wk拉米夫定治疗后, 检测其PBMC中的HBV cccDNA并随访1 a, 发现9例HBV cccDNA阳性者全部复发(100%), 而8例HBV cccDNA阴性者1例复发(12.5%), 更值得关注的是PBMC中HBV cccDNA阳性者其含量均不高; Yuen *et al*^[8]的研究也发现经拉米夫定治疗的患者血清中, HBV cccDNA明显低于服用安慰剂的对照组. 这些研究表明, 拉米夫定等抗病毒治疗的长期应用, 可通过间接作用消耗细胞中的HBV cccDNA, 提示适当长期抗病毒治疗有可能彻底清除体内HBV. HBV cccDNA作为抗病毒治疗的金指标, 由于其检测存在一定难度目前在临床上不能广泛开展, 需要寻找一种合适的替代指标, Zhou *et al*^[9]研究HepAD38细胞系发现HBeAg的合成和分泌与HBV cccDNA水平具有相关性, 吕其军 *et al*^[10]对各种类型的乙型肝炎研究发现血清中HBV

■背景资料

乙型肝炎病毒其基因组DNA是双链松弛环状分子rcDNA, 该分子的两条链均不是闭合的, 其中负链较长且长度固定, 为3200 bp, 正链较短且长度可变, 约为负链长度的50%-99%. 两条链通过5'端250-300个互补碱基的附着力重叠形成环状. cccDNA是rcDNA的正链在DNA聚合酶的作用下形成全长的rcDNA, 而后转运至核内构象发生改变而形成. cccDNA是乙型肝炎病毒复制的中间体, 是乙型肝炎病毒mRNA和前基因组RNA的合成模板, 是乙型肝炎病毒持续感染的关键因素.

■研究前沿

由于cccDNA在乙肝治疗方面具有重要意义,故cccDNA是目前研究的热点内容,目前广泛应用的抗病毒药物均不能彻底清除肝细胞内的cccDNA,开展对cccDNA的检测对临床有很好的指导意义。

cccDNA与血清HBeAg相关, HBeAg能否作为HBV cccDNA的一个替代指标还有待进一步研究。

1.3 肝脏损伤程度的指标 从理论上推测,既然存在于肝细胞胞质和线粒体中的氨基转移酶等酶类在肝细胞破坏时能释放到血液中,那么存在于肝细胞核内的HBV cccDNA分子在肝细胞变性、坏死时应该也可以释放到血液中,而且病情严重者,变性坏死的细胞更多,其血液中的HBV cccDNA水平也相应更高。在感染的肝细胞核内HBV cccDNA的数量是稳定的,一般维持在30-50拷贝/细胞^[11-12],故动态监测患者血液中的HBV cccDNA可以反映肝细胞变性坏死的数量。Chen *et al*^[13]持续追踪拉米夫定治疗后的患者发现,在ALT升高之前HBV cccDNA及总HBV已达到一个较高水平,一旦ALT升高,HBV cccDNA水平迅速下降,故监测血清中HBV cccDNA的水平似能更早反映肝脏的损伤程度。

1.4 肝外复制的关键指标 HBV是一种泛嗜性病毒,不仅能感染肝细胞,还能感染肾脏、胰腺及PBMC等,但这些细胞内是否存在HBV DNA复制目前还存在争议。HBV cccDNA作为HBV mRNA和前基因组RNA的合成模板,检测细胞内是否存在HBV cccDNA可以作为判断肝外组织有无HBV DNA复制的指标。Liu *et al*^[14]对49例慢性乙型肝炎患者外周血进行PCR扩增,发现PBMC中无HBV cccDNA而有HBV DNA存在,但其阳性率明显低于血清中HBV DNA,说明HBV是通过血液进入PBMC而不是在其中复制。最近又有研究发现^[15-16],PBMC中存在HBV cccDNA,说明PBMC中可能有HBV的复制,而且在部分急性乙型肝炎恢复期的患者PBMC中HBV cccDNA也呈阳性, Yuen *et al*^[17]也发现已发生HBsAg血清清除的部分患者肝细胞内存在低水平的HBV DNA,且以HBV cccDNA为主(71%-100%),故HBsAg阴性捐赠者器官移植后可发生受体HBV感染,HBsAg阴性患者接受免疫抑制治疗后也可发生HBV再复制。

2 PCR检测HBV cccDNA的方法

目前PCR检测HBV cccDNA大多是利用HBV cccDNA和乙型肝炎病毒松弛环状DNA(HBV relaxed circular DNA, HBV rcDNA)结构上存在差异,从而将两者区分开来。HBV rcDNA的2条链均有缺口,在缺口的上游设计引物,由于缺口的存在不能进行扩增;HBV cccDNA是由共价互

补完整的双链组成,因而能够进行扩增。

2.1 竞争PCR 其原理是在同一PCR体系中同时存在2种模板,一种是已知浓度的竞争模板,另一种是未知浓度的目标模板,两者共同竞争同一种引物。PCR完毕后定量2种模板的产物,当2种产物的量相等即等量点,此时加入PCR体系中的竞争模板就与目标模板相等。找到等量点,需进行一系列的PCR反应,每次用等量目标模板,不同量的竞争模板进行扩增。在整个操作过程中仍需进行凝胶电泳、Southern blot以及³²P标记的同位素探针来进行定量分析^[18]。Addison *et al*^[19]将竞争PCR法用于检测HBV cccDNA,通过酶切片段的倒置插入,使得目标模板和竞争模板的扩增产物经酶切后产生的片段大小不同而区分开。

2.2 巢式与半巢式PCR 巢式PCR是利用第1轮PCR产物作为第2轮PCR的模板,除使用第1轮的1对特异引物之外,在第2轮PCR反应中,使用1对新的特异引物,他们与模板DNA的结合位点处于第1轮引物扩增出的DNA片段内,这样在第2轮中错误扩增的可能性极低。半巢式PCR与巢式PCR原理相同,只是在第2轮PCR反应中使用的引物有1条为第1轮PCR的引物。PCR巢式和半巢式PCR均不能直接定量测定底物,需要在PCR反应后进行凝胶电泳来判断是否有特异的产物及定量测定。Torii *et al*^[15]用该法检测了10例急性乙型肝炎恢复期及14例慢性乙型肝炎患者,发现外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中存在HBV cccDNA,在急性乙型肝炎恢复期患者中有2例HBV cccDNA阳性(20%),在慢性乙型肝炎患者中有8例阳性(57.1%)。董庆鸣 *et al*^[20]应用巢式PCR法检测HBV cccDNA标准对照质粒,结果表明该法可以检测到 5×10^5 拷贝/L HBV cccDNA。

2.3 荧光定量PCR 该技术是在常规PCR基础上,运用荧光共振能量转移原理(fluorescence resonance energy transfer, FRET),荧光探针的发光基团所发出的荧光强度与PCR产物的数量呈对应关系,因此对荧光信号进行检测就可以实现对PCR产物的准确定量。这是目前应用最多的检测HBV cccDNA的方法。根据所用的探针和荧光化学原理的不同又可以分为Taqman技术、MBG技术、分子信标(molecular beacon)技术、蝎型探针(scorpion primer)技术、杂交探针(hybridization probe)技术等^[21]。He *et al*^[22]将MBG探针设计在负链缺口的下游与负链互补结合。HBV rcDNA由于上游引物引发的链的延伸不能通过

负链缺口, 故不能使MGB探针被Taq酶切断产生荧光信号; 而HBV cccDNA的两条链都是完整的, 能被扩增产生荧光信号, 其定量检测的动力学范围为 10^2 - 10^7 拷贝。Jun-Bin *et al*^[23]在利用Taqman探针进行的荧光定量PCR检测中设计了一条特殊嵌合引物, 其3'端与正链互补, 结合位点位于负链缺口上游顺向重复序列2(direct repeat 2, DR2)区下游; 5'端与人类免疫缺陷病毒(HIV)的部分核苷酸序列一致, 而与HBV DNA序列无同源性。首先用此嵌合引物对抽提产物做单链延伸15个循环, 然后取反应产物进行定量PCR, 其检测范围为 50 - 5×10^5 拷贝。由于HBV rcDNA的2条链均有缺口, 只是部分区域互补而形成环状结构, 但非超螺旋结构, 可以被某些核酸酶降解; HBV cccDNA 2条链均是完整的, 两者共价互补, 故能形成超螺旋结构而不会被核酸酶降解。Singh *et al*^[24]用plamid-safte™ ATP依赖的DNA酶消化底物后再进行PCR扩增, 提高了实验的特异性, 其检测HBV cccDNA的线性范围为 25 - 1×10^9 拷贝。

2.4 信号扩增分析 他不是传统的靶放大技术, 只是在正确的靶序列下产生和放大一个特定信号, 具有非常高的灵敏度, 不需要预先将靶序列放大就可在复杂混合物中进行靶核酸亚分子水平定量。该技术的关键是使用一个耐热的、结构特异的内切核酸酶, 根据结构而不是序列在特殊位点上切割核酸分子。他识别由外加的两个核苷酸探针与靶基因物质如DNA、RNA的核苷酸上形成的特殊结构(底物)。两个寡核苷酸, 一个是初始探针(primary probe), 另一个是侵入寡核苷酸(invader oligonucleotide), 纵向杂交到DNA的特异区域, 生成精确的侵入结构(底物)而被靶特异的切割酶识别。这种结构有一个未配对的“翼”(flap), 在初始探针寡核苷酸5'端上。当侵入结构(底物)形成时, 靶特异切割酶将这个5'端的“翼”切割下来, 而在FRET寡核苷酸探针上发生的第二次侵入裂解反应中, 释放的5'翼又充当了另一个侵入寡核苷酸, 再次形成侵入结构。第二个侵入切割反应进一步放大靶特异性产物, 切割下来的5'荧光素标记产物用荧光板读取器检测, 其荧光强度与初始探针靶量呈正比^[25]。Wong *et al*^[26]设计了MS1, PS2两条引物分别用来扩增总HBV DNA和HBV cccDNA。MS1位于负链的5'端DR2区的下游, 在HBV rcDNA及HBV cccDNA中均能形成特殊结构而被靶特异的切割酶识别产生荧光信号, PS2位于正链

的5'末端DR2区的上游, 由于HBV rcDNA的正链是不闭合不完整的, 不能形成特殊结构被靶特异的切割酶识别产生荧光信号, 从而把HBV cccDNA与其他形式的HBV DNA区别开来。

目前, HBV cccDNA的检测还没有成为临床常规检查手段, 随着PCR技术的进一步完善, HBV cccDNA有望成为临床评价抗病毒药物疗效的新指标, 可为评价乙型肝炎患者的病情提供新思路, 进一步促进新的抗病毒药物的研发。

3 参考文献

- Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 51-68
- Hatzakis A, Magiorkinis E, Haida C. HBV virological assessment. *J Hepatol* 2006; 44: S71-S76
- Yeh CT, Chiu HT, Chu CM, Liaw YF. G1 phase dependent nuclear localization of relaxed-circular hepatitis B virus DNA and aphidicolin-induced accumulation of covalently closed circular DNA. *J Med Virol* 1998; 55: 42-50
- Chou YC, Jeng KS, Chen ML, Liu HH, Liu TL, Chen YL, Liu YC, Hu CP, Chang C. Evaluation of transcriptional efficiency of hepatitis B virus covalently closed circular DNA by reverse transcription-PCR combined with the restriction enzyme digestion method. *J Virol* 2005; 79: 1813-1823
- Zoulim F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. *J Hepatol* 2005; 42: 302-308
- Sung JJ, Wong ML, Bowden S, Liew CT, Hui AY, Wong VW, Leung NW, Locarnini S, Chan HL. Intrahepatic hepatitis B virus covalently closed circular DNA can be a predictor of sustained response to therapy. *Gastroenterology* 2005; 128: 1890-1897
- 郭皓宇, 谭德明, 徐旭雯. 慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞中HBV cccDNA预测拉米夫定的治疗效果. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1202-1205
- Yuen MF, Wong DK, Sum SS, Yuan HJ, Yuen JC, Chan AO, Wong BC, Lai CL. Effect of lamivudine therapy on the serum covalently closed-circular (ccc) DNA of chronic hepatitis B infection. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1099-1103
- Zhou T, Guo H, Guo JT, Cuconati A, Mehta A, Block TM. Hepatitis B virus e antigen production is dependent upon covalently closed circular (ccc) DNA in HepAD38 cell cultures and may serve as a cccDNA surrogate in antiviral screening assays. *Antiviral Res* 2006
- 吕其军, 魏秀桂, 聂伟, 李毅, 田永刚, 黄黎. HBV感染者血清中HBV cccDNA、HBeAg及HBV DNA的关系. *临床肝胆病杂志* 2005; 21: 202-203
- Newbold JE, Xin H, Tencza M, Sherman G, Dean J, Bowden S, Locarnini S. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists *in situ* as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J Virol* 1995; 69: 3350-3357
- Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, Wursthorn K, Petersen J, Lau G, Trepo C, Marcellin P, Goodman Z, Delaney WE 4th, Xiong S, Brosgart CL, Chen SS, Gibbs CS, Zoulim F. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 2004; 126: 1750-1758

■创新盘点

本文结合检测方法方法进行综述, 能具体全面的了解cccDNA的各种不同的检测方法及其研究的意义所在, 为读者开启更广阔思路。

■应用要点

本文是对cccDNA各方面的一个总结性的概述,能使读者对HBV cccDNA有一个初步印象,为其进一步深入了解打下基础。

- 13 Chen Y, Sze J, He ML. HBV cccDNA in patients' sera as an indicator for HBV reactivation and an early signal of liver damage. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 82-85
- 14 Liu MC, Wang GQ, Piao WH, Zhang NL, Gong WB, Wang Y, Wang QH. Detection of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis B infection. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2004; 12: 249-250
- 15 Torii N, Hasegawa K, Joh R, Hayashi N. Configuration and replication competence of hepatitis B virus DNA in peripheral blood mononuclear cells from chronic hepatitis B patients and patients who have recovered from acute self-limited hepatitis. *Hepatol Res* 2003; 25: 234-243
- 16 董庆鸣, 魏红山, 刘顺爱, 郭晶晶, 宋淑静, 刘志英, 成军, 庄辉. 外周血单个核细胞中HBV cccDNA的定量检测. *中国医学检验杂志* 2005; 6: 258-260
- 17 Yuen MF, Wong DK, Sablon E, Tse E, Ng IO, Yuan HJ, Siu CW, Sander TJ, Bourne EJ, Hall JG, Condreay LD, Lai CL. HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B in the Chinese: virological, histological, and clinical aspects. *Hepatology* 2004; 39: 1694-1701
- 18 Addison WR, Walters KA, Wong WW, Wilson JS, Madej D, Jewell LD, Tyrrell DL. Half-life of the duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA pool *in vivo* following inhibition of viral replication. *J Virol* 2002; 76: 6356-6363
- 19 Addison WR, Wong WW, Fischer KP, Tyrrell DL. A quantitative competitive PCR assay for the covalently closed circular form of the duck hepatitis B virus. *Antiviral Res* 2000; 48: 27-37
- 20 董庆鸣, 魏红山, 庄辉, 宋淑静, 刘志英, 张四平, 戴旺苏. 套式聚合酶链反应法(nPCR)检测血清中HBV cccDNA. *中国医学检验杂志* 2005; 6: 168-170
- 21 Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 1292-1305
- 22 He ML, Wu J, Chen Y, Lin MC, Lau GK, Kung HF. A new and sensitive method for the quantification of HBV cccDNA by real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 295: 1102-1107
- 23 Jun-Bin S, Zhi C, Wei-Qin N, Jun F. A quantitative method to detect HBV cccDNA by chimeric primer and real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2003; 112: 45-52
- 24 Singh M, Dicaire A, Wakil AE, Luscombe C, Sacks SL. Quantitation of hepatitis B virus (HBV) covalently closed circular DNA (cccDNA) in the liver of HBV-infected patients by LightCycler real-time PCR. *J Virol Methods* 2004; 118: 159-167
- 25 Kwiatkowski RW, Lyamichev V, de Arruda M, Neri B. Clinical, genetic, and pharmacogenetic applications of the Invader assay. *Mol Diagn* 1999; 4: 353-364
- 26 Wong DK, Yuen MF, Yuan H, Sum SS, Hui CK, Hall J, Lai CL. Quantitation of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients. *Hepatology* 2004; 40: 727-737

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

● 消息 ●

专家门诊

本刊讯 《世界华人消化杂志》特设“专家门诊”固定专栏为广大消化病患者搭建一个信息平台,欢迎副主任医师以上的消化内科、普通外科专家为专栏撰稿(附单位介绍信),免收出版费,写作格式如下:

胃溃疡诊断和治疗

个人简介(附3.5 cm × 5 cm照片一张)

通信作者(包括邮政编码、工作单位、部门、科室、机构全称、地址、所在省市、E-mail)

0 引言

1 诊断

2 治疗

3 特色

4 门诊时间