

乙型肝炎病毒共价闭合环状DNA在慢性乙型肝炎治疗中的分子生物学研究进展

李保胜, 孙殿兴

■背景资料

共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)是乙型肝炎病毒(hepatitis B viral, HBV)前基因组RNA复制的模板, 虽然其含量较少, 每个肝细胞内只有约5-50个拷贝, 但对HBV的复制以及感染状态的建立具有十分重要的意义, 只有清除了细胞核内的cccDNA, 才能彻底消除乙型肝炎患者病毒携带状态, 是抗病毒治疗的目标。

李保胜, 孙殿兴, 中国人民解放军医学院 北京市 100853

孙殿兴, 中国人民解放军白求恩国际和平医院全军肝病中心 河北省石家庄市 050082

李保胜, 主治医师, 在读博士, 主要从事病毒性肝炎等传染性疾病的临床研究。

作者贡献分布: 此文章选题由孙殿兴设计并审阅; 文献收集资料查询及撰写由李保胜完成。

通讯作者: 孙殿兴, 教授, 主任医师, 博士生导师, 050082, 河北省石家庄市桥西区中山西路398号, 中国人民解放军白求恩国际和平医院全军肝病中心. sundianxing@hotmail.com
电话: 0311-87978434

收稿日期: 2016-02-19
修回日期: 2016-03-16
接受日期: 2016-03-29
在线出版日期: 2016-04-28

Role of covalently closed circular DNA in treatment of chronic hepatitis B

Bao-Sheng Li, Dian-Xing Sun

Bao-Sheng Li, Dian-Xing Sun, Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China

Dian-Xing Sun, Liver Disease Diagnosis and Treatment Center of PLA, Bethune International Peace Hospital of Chinese PLA, Shijiazhuang 050082, Hebei Province, China

Correspondence to: Dian-Xing Sun, Professor, Liver Disease Diagnosis and Treatment Center of PLA, Bethune International Peace Hospital of Chinese PLA, 398 Zhongshan West Road, Qiaoxi District, Shijiazhuang 050082, Hebei Province, China. sundianxing@hotmail.com

■同行评议者

何清, 主任医师, 深圳市第三人民医院肝病II科

Received: 2016-02-19
Revised: 2016-03-16
Accepted: 2016-03-29
Published online: 2016-04-28

Abstract

During hepatitis B virus (HBV) infection, covalently closed circular DNA (cccDNA) acts as the template for the synthesis of viral RNA and new virions. Current therapies rarely achieve an elimination of cccDNA. Biosynthesis of relaxed circular (RC) DNA by reverse transcription of the viral pregenomic RNA is now understood quite well, yet conversion of RC-DNA to cccDNA is still obscure. Conceptual and recent experimental data link cccDNA formation to cellular DNA repair, which is increasingly appreciated as a critical interface between cells and viruses. This review aims to summarize current knowledge on cccDNA molecular biology, to highlight the experimental restrictions that have hitherto hampered faster progress and to discuss cccDNA as a target for potentially curative therapies for chronic hepatitis B.

© 2016 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Chronic hepatitis B; Covalently closed circular DNA; Molecular biology; Therapeutic target

Li BS, Sun DX. Role of covalently closed circular DNA in treatment of chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2016; 24(12): 1824-1831 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/24/1824.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v24.i12.1824>

摘要

在乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染过程中, 共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)是病毒复制

产生的所有RNA和新病毒颗粒合成的模板, 而当前的治疗方法很难彻底清除cccDNA. 在cccDNA的产生过程中, 由病毒前基因组RNA反转录合成松弛环状(relaxed circular, rc)DNA的细节目前已经比较明确, 而对rcDNA转变为cccDNA的过程人们还知之甚少. 最近的研究把cccDNA的形成和细胞DNA修复联系起来, 并表明此过程是病毒与细胞相互作用的关键环节. 本文将综述cccDNA的分子生物学研究进展, 分析当前研究中遇到的障碍, 并讨论把cccDNA作为治疗慢性乙型肝炎的靶点的前景.

© 2016年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 慢性乙型肝炎; 共价闭合环状DNA; 分子生物学; 治疗靶点

核心提示: 如何彻底清除乙型肝炎病毒(hepatitis B virus)的关键性复制中间体共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)是当前慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)治疗中的一个难点. 本文将综述细胞DNA修复机制在cccDNA形成中的作用等分子生物学研究进展, 讨论把cccDNA作为治疗CHB靶点的前景.

李保胜, 孙殿兴. 乙型肝炎病毒共价闭合环状DNA在慢性乙型肝炎治疗中的分子生物学研究进展. 世界华人消化杂志 2016; 24(12): 1824-1831 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/24/1824.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v24.i12.1824>

0 引言

全世界至少有2.5亿人是HBV的慢性感染者^[1], 每年导致65万人死亡. 目前慢性乙型肝炎的治疗手段只有1型干扰素(interferons, IFN)和核苷(酸)类似物[nucleos(t)ide analogues, NAs], 由于严重的不良反应, 只有一部分患者可以接受干扰素治疗; NAs更容易耐受, 但能够清除HbsAg的病例非常少见(0%-5%)^[2], 而且, 治疗结束后病毒常常复燃^[3]. 在免疫抑制情况下, 一些急性感染HBV并痊愈的患者可以发生HBV再次活动, 提示HBV未被完全清除. 目前认为HBV持续感染的关键因素是未能彻底清除共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA), 然而, 由于缺乏合适的实验模型, 至今对cccDNA的产生和分解仍了解不多. 最近的发现有助于改变这一现状, 尤其是钠离

子/牛磺胆酸共转运多肽(sodium taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP)被鉴定为HBV和HDV进入细胞的受体, 他与HBV的表面蛋白相互作用使病毒进入细胞^[4,5]. 在这里我们将综述cccDNA的分子生物学研究进展, 并讨论以cccDNA作为治疗靶点的应用前景.

1 cccDNA在HBV复制中的关键角色

HBV的基因组位于核衣壳之中, 为部分双链的松弛环状(relaxed circular, rc)DNA, 其负链的5'端与P蛋白共价结合. HBV通过其表面蛋白的暴露部分与敏感细胞表面的葡糖氨基聚糖相互作用从而聚集在靶细胞表面^[6,7], 大蛋白的PreS1区与NTCP结合, 在其他的类似宿主因子共同作用下^[8], 触发病毒颗粒被摄取的过程. 当HBV进入细胞后, 核衣壳在核膜的微孔处分解^[9], rcDNA被释放到核浆中. 在胞核中, rcDNA转变为关键性的复制中间体cccDNA, 然后, 以cccDNA为模板转录产生一组包括前基因组(pregenomic, pg)RNA在内的转录本, pgRNA是HBV逆转录的模板, 参与HBV DNA的复制过程, 其他RNA则在胞浆翻译产生表面蛋白、X蛋白及C蛋白前体等.

接下来在子代核衣壳中产生结构独特的rcDNA. 首先P蛋白与pgRNA 5'端的ε茎环结构共价结合, 二者共同被包装到新的核衣壳中, 然后P蛋白催化逆转录合成负链DNA. 在催化反应中, P蛋白末端独特结构域的一个酪氨酸残基作为受体接受负链DNA第一个核苷酸, 结果形成一个酪氨酰-5'-DNA-磷酸二酯键, 并维持到rcDNA的最终形成. 负链DNA最初的3-4个核苷酸以ε茎环结构内的凸起区为模板, 随后转移到位于3'端同向重复序列1(direct repeat 1, DR1)内一个相匹配的受体基序, 从此处向pgRNA模板5'端的延长, 产生一条与pgDNA互补的负链DNA. 随着DNA的合成, 大多数pgRNA被P蛋白的RNase H活性(一个潜在的治疗新靶点^[10])降解, 未被降解的pgRNA 5'残基随后作为合成正链DNA的引物. 最终形成rcDNA, 其负链稍长, 5'端共价结合着P蛋白, 不完全的正链的5'端由RNA引物构成, 这些结构特点是理解rcRNA向cccDNA转化的关键点. 当表面蛋白包装容纳着成熟rcRNA的核壳体后, 一个完整的HBV感染周期完成; 当表面蛋白不足时, 新产生的rcDNA会重新进入胞核,

■ 研究前沿

目前对HBV cccDNA的认识尚有很多不足. 在检测技术上有许多问题需要解决, 比如, 如何提高灵敏度, 如何简化操作步骤等. 由于缺乏经济和便于使用的小型动物实验模型, 对cccDNA作为临床评价指标的意义也有待进一步研究, 比如, 抗病毒新药对cccDNA的作用; HBV感染基础上发生的肝衰竭, 其病情和预后能否通过cccDNA水平获取一定信息; 肝外组织感染的问题也可以通过检测组织细胞中是否存在cccDNA得到解释; 以cccDNA为靶标的基因治疗或免疫治疗; cccDNA与肝细胞基因组整合对肝细胞癌变等的意义.

■ 相关报道

Guo等在2015年的文章中总结了在cccDNA在肝细胞内代谢和免疫及病理生理调节的研究; Kennedy等在2015年的文章中探讨将CRISPR/Cas9基因编辑系统用于破坏细胞核内cccDNA的可能; Zhang等在2015年的文章总结了免疫调节剂对控制CHB和清除cccDNA的临床前研究。

从而放大cccDNA的数量。因为缺乏合适的实验模型, 当前对上述过程的了解来源于对鸭HBV模型的研究。

停用核苷类似物药物或接受免疫抑制治疗后出现常常发生病毒再次复制, 这表明cccDNA可以在人体持续存在数十年, 但是很难精确衡量体内cccDNA数量的动态变化。在对WHV慢性感染的土拨鼠和DHBV感染的鸭的研究中发现cccDNA半寿期约为33-57 d, 在黑猩猩急性感染的病毒清除期, cccDNA的半寿期不超过3 d, 但有微量的cccDNA可以持续存在数年。综合这些数据证明在慢性感染中cccDNA池的长期存在, 该池的稳态受许多因素影响, cccDNA分子不断产生和失去, 我们尚不能确定某个cccDNA分子的寿命, 尽管这对于直接以cccDNA为靶点的治疗是非常重要的问题。

2 宿主DNA修复机制参与rcDNA向cccDNA转化过程

在大多数情况下, cccDNA直接由HBV病毒颗粒的rcDNA转变而来, 在此过程中, 要完成对rcDNA一些独特结构的修饰, 这些结构包括: 在5'端的P蛋白和RNA引物、正链部分缺失、负链末端冗余结构。其中某些修饰步骤可能是由P蛋白来执行的。然而, 在感染模型中, 用NAs抑制P蛋白对cccDNA的产生完全没有影响或仅有部分程度的影响, 这表明对NAs不敏感的宿主DNA多聚酶可以完成这些修饰步骤。

2.1 DNA修复机制参与rcDNA向cccDNA转化的理论依据 由于P蛋白具有酪氨酰-DNA-磷酸二酯酶活性, 能以自催化方式断开其与rcDNA共价结合的酪氨酰-DNA-磷酸二酯键, 从而自rcDNA上脱落, 这与拓扑异构酶(topoisomerases, TOP)的作用方式类似。TOP通过在单链(TOP1)或双链(TOP2)上刻痕来调节DNA超螺旋化, 以减少复制或转录过程中的扭转压力^[11], 切断DNA骨架释放的能量贮存在新形成的酪氨酸-DNA-磷酸二酯键中, 这种转酯反应是可逆的, 能让DNA链重新闭合及让酶脱落, 但这种原路返回式的反应需要DNA链的两个断端在空间上成直线, 已发现某些药物影响可以使TOP-DNA加合物显著增加, 以至于分裂复合体中的DNA被扭曲^[11,12]。从rcDNA上去除P蛋白以及负链环化, 需要正确地去除负链

上3'端的冗余序列, 此活动很难归因于P蛋白的作用; 同样, P蛋白不能完成从正链上去除RNA引物以及封闭单链或两条链上的开口的修饰, 因此, 大多数由rcDNA到cccDNA的转变是由宿主细胞执行的, 实际上, 这些活动都属于是DNA修复的范围。

基因组的完整性对于有机体保持活性至关重要, 然而又不断受到破坏。不但DNA双链断裂有害, 而且各种其他形式的DNA修改可以影响复制和转录, 可能诱导致命的突变, 这些因素包括单链断开、复制错误、交联、碱基修饰、DNA加合物。一个哺乳动物细胞每天可能遭受 $>10^4$ 次有害事件^[13], 因此所有的细胞都具备复杂的DNA修复机制, 有250个以上的组分用来探测DNA损伤、发信号停止细胞循环以及修复损伤, 在后生动物, 修复失败通常会诱导凋亡或癌变。越来越受重视的是, 在病毒复制的核内阶段, 病毒不得不应付这些监视系统, 或者通过直接占用, 或者将其视为细胞防御机制而克服^[14-16]。乳头瘤病毒可以利用DNA修复和细胞周期的联系, 控制宿主细胞进入一个有利于病毒复制的阶段, 并阻断凋亡^[17]; 腺病毒的线性双链DNA基因组被宿主细胞识别为双链断裂, 被修复成多联体, 以至于太大而不能包装, 利用其早期蛋白, 腺病毒通过钝化DNA修复机制中的关键组件来抵抗这种细胞应答^[16], 包括探测双链断裂的MRN复合体^[18,19]。类似的, 嗜肝病毒rcDNA的许多特征也能够触发DNA损伤修复机制, 然而, 对这一过程的研究才刚刚开始。

2.2 DNA修复机制参与rcDNA向cccDNA转化的实验证据 嗜肝病毒rcDNA在结构上最显著的特征是负链的5'端与P蛋白以磷酸二酯键共价结合, 其连接方式与TOP裂解复合体的磷酸酪氨酰键非常类似。宿主细胞可以利用酪氨酸-DNA-磷酸二酯酶(tyrosyl-DNA-phosphodiesterases, TDPs)^[12]对DNA加合物进行修复处理。TDP1主要作用于3'端连接的TOP1加合物, 然而, 有的研究^[20-22]显示他也有5'活性, 可能与特定物种有关; TDP2则优先处理5'底物。因此, 这两种酶都有从rcDNA释放5'端的以酪氨酸-磷酸二酯键结合的P蛋白潜在能力。

有研究者利用重组TDP酶(人和鸡的TDP2)可以高效切开一种合成的具有5'磷酸酪

氨酸结构的底物^[23]。在DHBV的P蛋白也观察到类似的情况, 其短DNA寡核苷酸与外部结合, 发生蛋白引物反应^[24,25], 还在细胞培养产生的核壳体观察到真正的DHBV和HBV rcDNA。这些证据证实: 在病毒复制过程中, TDP2作为一个宿主细胞的DNA修复因子, 具有切除rcDNA 5'末端P蛋白的活性。

由于去除P蛋白是rcDNA转变为cccDNA的必需步骤, 阻断这个环节可能会导致cccDNA生成障碍。因此, 有研究者制备了一种HepG2细胞, 可以稳定表达TDP2特异的shRNA, 能够持久的抑制TDP2表达的。然后这些TDP2敲除细胞和天然的HepG2细胞分别转染携带包膜缺失DHBV的基因组的载体, 并开始病毒复制, 用Southern blot比较rcDNA和cccDNA的产量。发现降低TDP2水平显著延缓rcDNA向cccDNA转化速度, 然而, 最终两组细胞内rcDNA和cccDNA的数量水平和比例无差别, 表明cccDNA的产生可以被延迟但不能被阻断。对此直观的解释是残余的少量TDP2仍然可以让rcDNA进入转化通路, 只是cccDNA形成的速度明显降低。然而, 这些数据还用一些更复杂的理论来解释, 那就是广泛存在的DNA修复的冗余机制可以发挥替代作用^[26], 对于TOP裂解复合体修复途径, 数个核溶解通路可以替代完成TDP介导的修复^[11,27]。因此, 在TDP2敲除细胞, rcDNA可经旁路途径将P蛋白去除, 进而转变为cccDNA, 只是转变过程变慢了。

3 以cccDNA为靶点的抗HBV治疗策略

cccDNA池的存在是HBV持续感染的根源, 目前的治疗方法均很难清除HBV, 直接以cccDNA为靶点的疗法是一种新的策略, 从阻断其产生、直接消除以及沉默其复制中间体的作用等几个方面研究者们做了很多的努力, 取得了一些进展。

3.1 控制从rcDNA向cccDNA的转变 现有资料提示TDP2以及类似的其他参与rcDNA向cccDNA转变的宿主因素有可能成为治疗靶点, 抑制这个过程应该可以阻止cccDNA池的形成。不过需要先明确几个问题, 首要的是cccDNA持久存在的原因, 或者是个别分子长寿, 或者是cccDNA在不断更新, 这需要在技术上能够监视单个cccDNA分子的命运, 现在看来这将

是一个非比寻常的难题。不考虑cccDNA更新, 抑制rcDNA转变成cccDNA只是对初始感染起作用, 也就是预防。有趣的是, 在预先感染了低剂量HBV的人肝嵌合小鼠, 用阻断HBV被摄取的药物Myrcludex B治疗后, 不仅阻止了病毒感染其他细胞, 还可能抑制已感染细胞内rcDNA向转变cccDNA, 导致cccDNA的数量无明显增多^[28], 虽然暗示cccDNA的从头合成可以发生, 这些结果还需要在临床中证实。

第二个关键问题是以某个DNA修复因子为治疗靶点可能影响宿主细胞的DNA损伤修复, 这时修复系统的冗余具有两面性, 一方面, 在rcDNA向cccDNA转变的过程中, P蛋白可能以不同的机制被释放, 阻断其中的一个通路并不能影响cccDNA形成; 相反, 冗余机制也许是有益的, 可能某一个靶点对病毒至关重要, 但宿主细胞还有其他备用机制, 从而不受影响。这需要综合考虑涉及的宿主因素, 设计高效的筛选方案, 例如, 通过RNA干扰或先进的基因敲除技术, 筛选小化合物抑制剂, 例如, 一个新近的研究表明小分子可以干扰cccDNA的形成, 尽管其机制未明^[29]。

另外一个防止形成cccDNA池的策略是阻止rcDNA到达细胞核。由于核转运依靠核衣壳, 也许正在研发^[30]的靶向衣壳的药物能够阻断cccDNA的产生^[31], 或者用诱导组装空衣壳或不规则聚合物的方式, 或者通过破坏现存的核衣壳^[32,33], 若核衣壳被破坏, 被释放到胞浆中的rcDNA将不能进入细胞核, 并且可能被胞浆中DNA感应器如循环GMP-AMP合酶检测到, 进而激活干扰素基因*STING*并诱导产生1型干扰素^[34,35], 为了屏蔽这个防御系统可能是HBV的逆转录发生在核衣壳内部的原因之一, 并且rcDNA需要被完整的核衣壳转运到细胞核^[9]。然而, 现有的cccDNA池仅仅受cccDNA更新与否的影响。

3.2 清除肝脏的cccDNA 稳定的cccDNA水平取决于其产生与丢失的对比, 如果不能防止产生新的cccDNA, 那么尽量消除现有cccDNA可能是最直接的方法, 当前有两个主要的策略, 一是模拟HBV急性感染的免疫介导的清除, 可以清除绝大部分cccDNA, 第二是利用人工核酸内切酶。

清除肝细胞中cccDNA有两种方式, 其一是T细胞破坏几乎所有带cccDNA的细胞, 然

■创新盘点

本文总结近5年的最新文献, 结合近年cccDNA在分子生物学方面的研究, 总结了当前以清除cccDNA为目标的治疗研究进展。

应用要点

本文或可帮助临床医理解cccDNA在HBV感染中的作用, 并对当前以彻底清除cccDNA为目的治疗研究现状有较全面的了解。

后用非感染细胞取代, 另一是不破坏细胞而清除cccDNA, 在疾病中这两个机制同时存在, 但相对贡献度不易区分, 这是由于参与的因素多且很难去评估, 这些因素包括: 在细胞分裂过程中cccDNA是否以及如何再次进入新产生的细胞核; 载有cccDNA细胞和不载有cccDNA细胞的更新周期, 以及cccDNA转录活性的影响; 不易感细胞和抵抗免疫清除细胞的起源、分组及增殖特点。除上述问题之外, 干扰素等细胞因子可能扮演了重要的角色, 尽管确切的机制还不明确。一个新近的研究^[36]显示: 高剂量的IFN- α 或强烈激活淋巴毒素- β 受体, 可以上调APOBEC3A(apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A)的表达, 作用于DNA负链使之去氨基, 直接破坏cccDNA的完整性, 从而被修复途径降解。另一个研究中, 在慢性感染的黑猩猩, TLR-7激动剂GS-9620诱导清除HBV感染的细胞^[37], 这凸显了激活天然免疫应答的价值。通过免疫机制降低cccDNA的研究中, 引人注意的是在一些情况下cccDNA池降低到一定程度就不再减少^[36], 这可能是由于cccDNA的避难所细胞, 或者, cccDNA自身的一些不同的形式, 例如甲基化、染色质修饰或一些其他的性质。或许, 某些诱导cccDNA降解的非自然手段可能会对顽固的cccDNA池有作用。

人工核酸内切酶的应用已经推进了cccDNA相关的研究^[38-41]。然而, 大量的问题还没有解决, 首先是核酸酶作用于cccDNA的途径, 除非携带cccDNA的细胞能被特异锁定, 核酸酶必需被递送到所有的肝细胞, 包括线性DNA整合在内的脱靶效应可能对肝细胞功能起到相反的影响, 尤其是在需要效应酶长期存在的情况时。还有, 非同源的黏合系统(non-homologous end-joining, NHEJ)介导修复双链DNA断裂容易出错^[42], 部分修复会导致未受损cccDNA发生重构。也很重要, 目前还不清楚在同一个细胞内rcDNA过剩会如何影响cccDNA的定位效率。清除cccDNA还需要进行更多的研究, 还有很大的空间来发展其他的策略, 包括治疗性疫苗、反义RNA、RNA干扰衍生的手段^[30]。

3.3 沉默cccDNA的转录活性 越来越多的证据表明cccDNA的转录活性受表观遗传控制, 因此利用细胞的表观遗传学机制^[43]有可能对

cccDNA进行功能灭活, 尽管不能清除cccDNA。模型研究显示IFN- α 治疗是一种可能的选择^[44,45]。另外, HBx可能是一个抗病毒的直接药物靶点, 因为在HBV进入细胞的环节, 他似乎是表观遗传学控制cccDNA的转录所必需的^[46], 但其中机制十分复杂, 因为与HBx相互作用的因子数量众多^[47], 他们在感染中的相关性不确定, 而且使用的测试系统本身也不能除外HBx的影响^[48]。DNA损伤结合蛋白(DNA damage-binding protein, DDB)1^[49]是一种有希望的蛋白, DDB1与HBx结合对病毒的感染能力有明显的影响, DDB1与他的配体DDB2识别紫外线诱导的DNA变性, 并形成一个E3泛素连接酶复合体用于介导降解多种底物^[50]。值得注意的是, 在cccDNA存在时, 就需要持续阻止HBx与其细胞配体的相互作用。此外, 当细胞内存在无转录活性cccDNA时, 细胞对免疫介导的cccDNA清除机制显得更不敏感^[51], 因此需要对这个思路进行更多的研究评估。

4 结论

cccDNA在HBV持续感染中的重要性已得到证实, 所以, 治愈慢性乙型肝炎的疗法应以清除cccDNA为目标, 目前在阻止cccDNA的形成、促进cccDNA的清除以及沉默其转录活性等方面进行了许多尝试, 取得了一定的进展, 但人们对cccDNA的形成和降解仍认识不足, 目前已经培育成功了感染细胞系, 小动物感染模型的建立也有进展, 这将显著改变目前的困境。有关cccDNA的生物化学的新知识, 对急性HBV感染时机体免疫系统如何处理cccDNA的分子机制, 以及对DNA进行操作的新技术, 这些进展将有助于最终实现彻底地清除cccDNA, 将使慢性乙型肝炎的治疗研究取得像慢性丙型肝炎那样的成功^[52]。

5 参考文献

- Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine* 2012; 30: 2212-2219 [PMID: 22273662 DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.12.116]
- Trépo C, Chan HL, Lok A. Hepatitis B virus infection. *Lancet* 2014; 384: 2053-2063 [PMID: 24954675 DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60220-8]
- Chevaliez S, Hézode C, Bahrami S, Grare M, Pawlotsky JM. Long-term hepatitis B surface antigen (HBsAg) kinetics during nucleoside/nucleotide analogue therapy: finite treatment

- duration unlikely. *J Hepatol* 2013; 58: 676-683 [PMID: 23219442 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.11.039]
- 4 Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 2012; 1: e00049 [PMID: 23150796 DOI: 10.7554/eLife.00049]
 - 5 Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, Nkongolo S, Kaufman C, Fälth M, Stindt J, Königer C, Nassal M, Kubitz R, Sülthmann H, Urban S. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate cotransporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* 2014; 146: 1070-1083 [PMID: 24361467 DOI: 10.1053/j.gastro.2013.12.024]
 - 6 Lamas Longarela O, Schmidt TT, Schöneweis K, Romeo R, Wedemeyer H, Urban S, Schulze A. Proteoglycans act as cellular hepatitis delta virus attachment receptors. *PLoS One* 2013; 8: e58340 [PMID: 23505490 DOI: 10.1371/journal.pone.0058340]
 - 7 Sureau C, Salisse J. A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant. *Hepatology* 2013; 57: 985-994 [PMID: 23161433 DOI: 10.1002/hep.26125]
 - 8 Baumert TF, Meredith L, Ni Y, Felmler DJ, McKeating JA, Urban S. Entry of hepatitis B and C viruses - recent progress and future impact. *Curr Opin Virol* 2014; 4: 58-65 [PMID: 24418809 DOI: 10.1016/j.coviro.2013.12.002]
 - 9 Schmitz A, Schwarz A, Foss M, Zhou L, Rabe B, Hoellenriegel J, Stoeber M, Panté N, Kann M. Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000741 [PMID: 20126445 DOI: 10.1371/journal.ppat.1000741]
 - 10 Cai CW, Lomonosova E, Moran EA, Cheng X, Patel KB, Bailly F, Cotelle P, Meyers MJ, Tavis JE. Hepatitis B virus replication is blocked by a 2-hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-dione (HID) inhibitor of the viral ribonuclease H activity. *Antiviral Res* 2014; 108: 48-55 [PMID: 24858512 DOI: 10.1016/j.antiviral.2014.05.007]
 - 11 Ashour ME, Attaya R, El-Khamisy SF. Topoisomerase-mediated chromosomal break repair: an emerging player in many games. *Nat Rev Cancer* 2015; 15: 137-151 [PMID: 25693836 DOI: 10.1038/nrc3892]
 - 12 Pommier Y, Huang SY, Gao R, Das BB, Murai J, Marchand C. Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2). *DNA Repair (Amst)* 2014; 19: 114-129 [PMID: 24856239 DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.03.020]
 - 13 Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* 2009; 361: 1475-1485 [PMID: 19812404 DOI: 10.1056/NEJMra0804615]
 - 14 Turnell AS, Grand RJ. DNA viruses and the cellular DNA-damage response. *J Gen Virol* 2012; 93: 2076-2097 [PMID: 22855786 DOI: 10.1099/vir.0.044412-0]
 - 15 Weitzman MD, Weitzman JB. What's the damage? The impact of pathogens on pathways that maintain host genome integrity. *Cell Host Microbe* 2014; 15: 283-294 [PMID: 24629335 DOI: 10.1016/j.chom.2014.02.010]
 - 16 Weitzman MD, Lilley CE, Chaurushiya MS. Genomes in conflict: maintaining genome integrity during virus infection. *Annu Rev Microbiol* 2010; 64: 61-81 [PMID: 20690823 DOI: 10.1146/annurev.micro.112408.134016]
 - 17 Wallace NA, Galloway DA. Manipulation of cellular DNA damage repair machinery facilitates propagation of human papillomaviruses. *Semin Cancer Biol* 2014; 26: 30-42 [PMID: 24412279 DOI: 10.1016/j.semcancer.2013.12.003]
 - 18 Paull TT. Mechanisms of ATM Activation. *Annu Rev Biochem* 2015; 84: 711-738 [PMID: 25580527 DOI: 10.1146/annurev-biochem-060614-034335]
 - 19 Williams RS, Williams JS, Tainer JA. Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochem Cell Biol* 2007; 85: 509-520 [PMID: 17713585 DOI: 10.1139/O07-069]
 - 20 Nitiss JL, Nitiss KC. Tdp2: a means to fixing the ends. *PLoS Genet* 2013; 9: e1003370 [PMID: 23505391 DOI: 10.1371/journal.pgen.1003370]
 - 21 Cortes Ledesma F, El Khamisy SF, Zuma MC, Osborn K, Caldecott KW. A human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage. *Nature* 2009; 461: 674-678 [PMID: 19794497 DOI: 10.1038/nature08444]
 - 22 Gómez-Herreros F, Romero-Granados R, Zeng Z, Alvarez-Quilón A, Quintero C, Ju L, Umans L, Vermeire L, Huylebroeck D, Caldecott KW, Cortés-Ledesma F. TDP2-dependent non-homologous end-joining protects against topoisomerase II-induced DNA breaks and genome instability in cells and in vivo. *PLoS Genet* 2013; 9: e1003226 [PMID: 23505375 DOI: 10.1371/journal.pgen.1003226]
 - 23 Königer C, Wingert I, Marsmann M, Rösler C, Beck J, Nassal M. Involvement of the host DNA-repair enzyme TDP2 in formation of the covalently closed circular DNA persistence reservoir of hepatitis B viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: E4244-E4253 [PMID: 25201958 DOI: 10.1073/pnas.1409986111]
 - 24 Stahl M, Beck J, Nassal M. Chaperones activate hepadnavirus reverse transcriptase by transiently exposing a C-proximal region in the terminal protein domain that contributes to epsilon RNA binding. *J Virol* 2007; 81: 13354-13364 [PMID: 17913810 DOI: 10.1128/JVI.01196-07]
 - 25 Stahl M, Retzlaff M, Nassal M, Beck J. Chaperone activation of the hepadnaviral reverse transcriptase for template RNA binding is established by the Hsp70 and stimulated by the Hsp90 system. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 6124-6136 [PMID: 17804463 DOI: 10.1093/nar/gkm628]
 - 26 Thompson LH. Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography. *Mutat Res* 2016; 751: 158-246 [PMID: 22743550 DOI: 10.1016/j.mrrev.2012.06.002]
 - 27 Maede Y, Shimizu H, Fukushima T, Kogame T, Nakamura T, Miki T, Takeda S, Pommier Y, Murai J. Differential and common DNA repair pathways for topoisomerase I- and II-targeted drugs in a genetic DT40 repair cell screen panel. *Mol Cancer*

名词解释

钠离子牛磺胆酸共转运多肽 (NTCP): 一种具有胆酸转运功能的多肽类物质, 通常在人肝细胞表面表达, 2012年被我国科学家鉴定为乙型肝炎和丁型肝炎病毒的功能性受体。

同行评价

HBV cccDNA是近年来肝病领域的研究热点, 本文的综述具备一定的学术科研价值, 文中引用研究内容大部分较前沿, 为临床及科研人员提供了很好的理论依据。

- 28 Volz T, Allweiss L, Ben MBarek M, Warlich M, Lohse AW, Pollok JM, Alexandrov A, Urban S, Petersen J, Lütgehetmann M, Dandri M. The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus. *J Hepatol* 2013; 58: 861-867 [PMID: 23246506 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.12.008]
- 29 Cai D, Mills C, Yu W, Yan R, Aldrich CE, Saputelli JR, Mason WS, Xu X, Guo JT, Block TM, Cuconati A, Guo H. Identification of disubstituted sulfonamide compounds as specific inhibitors of hepatitis B virus covalently closed circular DNA formation. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 4277-4288 [PMID: 22644022 DOI: 10.1128/AAC.00473-12]
- 30 Zeisel MB, Lucifora J, Mason WS, Sureau C, Beck J, Levrero M, Kann M, Knolle PA, Benkirane M, Durantel D, Michel ML, Autran B, Cosset FL, Strick-Marchand H, Trépo C, Kao JH, Carrat F, Lacombe K, Schinazi RF, Barré-Sinoussi F, Delfraissy JF, Zoulim F. Towards an HBV cure: state-of-the-art and unresolved questions--report of the ANRS workshop on HBV cure. *Gut* 2015; 64: 1314-1326 [PMID: 25670809 DOI: 10.1136/gutjnl-2014-308943]
- 31 Katen SP, Tan Z, Chirapu SR, Finn MG, Zlotnick A. Assembly-directed antivirals differentially bind quasiaequivalent pockets to modify hepatitis B virus capsid tertiary and quaternary structure. *Structure* 2013; 21: 1406-1416 [PMID: 23871485 DOI: 10.1016/j.str.2013.06.013]
- 32 Zlotnick A, Mukhopadhyay S. Virus assembly, allostery and antivirals. *Trends Microbiol* 2011; 19: 14-23 [PMID: 21163649 DOI: 10.1016/j.tim.2010.11.003]
- 33 Bourne CR, Finn MG, Zlotnick A. Global structural changes in hepatitis B virus capsids induced by the assembly effector HAP1. *J Virol* 2006; 80: 11055-11061 [PMID: 16943288 DOI: 10.1128/JVI.00933-06]
- 34 Cai X, Chiu YH, Chen ZJ. The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling. *Mol Cell* 2014; 54: 289-296 [PMID: 24766893 DOI: 10.1016/j.molcel.2014.03.040]
- 35 Hornung V, Hartmann R, Ablasser A, Hopfner KP. OAS proteins and cGAS: unifying concepts in sensing and responding to cytosolic nucleic acids. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 521-528 [PMID: 25033909 DOI: 10.1038/nri3719]
- 36 Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, Zhang K, Stadler D, Cheng X, Sprinzl MF, Koppensteiner H, Makowska Z, Volz T, Remouchamps C, Chou WM, Thasler WE, Hüser N, Durantel D, Liang TJ, Münk C, Heim MH, Browning JL, Dejardin E, Dandri M, Schindler M, Heikenwalder M, Protzer U. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science* 2014; 343: 1221-1228 [PMID: 24557838 DOI: 10.1126/science.1243462]
- 37 Lanford RE, Guerra B, Chavez D, Giavedoni L, Hodara VL, Brasky KM, Fosdick A, Frey CR, Zheng J, Wolfgang G, Halcomb RL, Tumas DB. GS-9620, an oral agonist of Toll-like receptor-7, induces prolonged suppression of hepatitis B virus in chronically infected chimpanzees. *Gastroenterology* 2013; 144: 1508-1517. 1517.e1-e10 [PMID: 23415804 DOI: 10.1053/j.gastro.2013.02.003]
- 38 Weber ND, Stone D, Sedlak RH, De Silva Feelixge HS, Roychoudhury P, Schiffer JT, Aubert M, Jerome KR. AAV-mediated delivery of zinc finger nucleases targeting hepatitis B virus inhibits active replication. *PLoS One* 2014; 9: e97579 [PMID: 24827459 DOI: 10.1371/journal.pone.0097579]
- 39 Seeger C, Sohn JA. Targeting Hepatitis B Virus With CRISPR/Cas9. *Mol Ther Nucleic Acids* 2014; 3: e216 [PMID: 25514649 DOI: 10.1038/mtna.2014.68]
- 40 Cradick TJ, Keck K, Bradshaw S, Jamieson AC, McCaffrey AP. Zinc-finger nucleases as a novel therapeutic strategy for targeting hepatitis B virus DNAs. *Mol Ther* 2010; 18: 947-954 [PMID: 20160705 DOI: 10.1038/mt.2010.20]
- 41 Bloom K, Ely A, Mussolino C, Cathomen T, Arbutnot P. Inactivation of hepatitis B virus replication in cultured cells and in vivo with engineered transcription activator-like effector nucleases. *Mol Ther* 2013; 21: 1889-1897 [PMID: 23883864 DOI: 10.1038/mt.2013.170]
- 42 Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* 2010; 79: 181-211 [PMID: 20192759 DOI: 10.1146/annurev.biochem.052308.093131]
- 43 Murr R. Interplay between different epigenetic modifications and mechanisms. *Adv Genet* 2010; 70: 101-141 [PMID: 20920747 DOI: 10.1016/B978-0-12-380866-0.60005-8]
- 44 Belloni L, Pollicino T, De Nicola F, Guerrieri F, Raffa G, Fanciulli M, Raimondo G, Levrero M. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 19975-19979 [PMID: 19906987 DOI: 10.1073/pnas.0908365106]
- 45 Liu F, Campagna M, Qi Y, Zhao X, Guo F, Xu C, Li S, Li W, Block TM, Chang J, Guo JT. Alpha-interferon suppresses hepadnavirus transcription by altering epigenetic modification of cccDNA minichromosomes. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003613 [PMID: 24068929 DOI: 10.1371/journal.ppat.1003613]
- 46 Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, Belloni L, Strubin M, Levrero M, Zoulim F, Hantz O, Protzer U. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatol* 2011; 55: 996-1003 [PMID: 21376091 DOI: 10.1016/j.jhep.2011.02.015]
- 47 Zhang T, Xie N, He W, Liu R, Lei Y, Chen Y, Tang H, Liu B, Huang C, Wei Y. An integrated proteomics and bioinformatics analyses of hepatitis B virus X interacting proteins and identification of a novel interactor apoA-I. *J Proteomics* 2013; 84: 92-105 [PMID: 23568022 DOI: 10.1016/j.jprot.2013.03.028]
- 48 Slagle BL, Andrisani OM, Bouchard MJ, Lee CG, Ou JH, Siddiqui A. Technical standards for hepatitis B virus X protein (HBx) research. *Hepatology* 2015; 61: 1416-1424 [PMID: 25099228 DOI: 10.1002/hep.27360]
- 49 Li T, Robert EI, van Breugel PC, Strubin M, Zheng N. A promiscuous alpha-helical motif anchors viral hijackers and substrate receptors to the

- CUL4-DDB1 ubiquitin ligase machinery. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17: 105-111 [PMID: 19966799 DOI: 10.1038/nsmb.1719]
- 50 Marteiin JA, Lans H, Vermeulen W, Hoeijmakers JH. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 465-481 [PMID: 24954209 DOI: 10.1038/nrm3822]
- 51 Reaiche GY, Le Mire MF, Mason WS, Jilbert AR. The persistence in the liver of residual duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA is not dependent upon new viral DNA synthesis. *Virology* 2010; 406: 286-292 [PMID: 20705309 DOI: 10.1016/j.virol.2010.07.013]
- 52 Pawlotsky JM. New hepatitis C therapies: the toolbox, strategies, and challenges. *Gastroenterology* 2014; 146: 1176-1192 [PMID: 24631495 DOI: 10.1053/j.gastro.2014.03.003]

编辑: 郭鹏 电编: 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2016年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, Vmax不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var. *glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学学中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{max}, C_{max}, Vd, T_{1/2} CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
8226 Regency Drive, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

