

NHLDC  
2005.第十二次  
全国病毒性肝炎与肝病学术会议  
The 12th National Hepatitis and  
Liver Disease Conference

会前事宜 Introduction

征文通知

会议通知

学术和工作委员会

筹备会会议纪要

审(定)稿会计划

大会计划

会议日程

大会详情 Meeting

专题报告

大会发言

资料下载

advertisement

[首页](#) > [专题报告](#) > [正文](#)

## 13. 乙型肝炎病毒cccDNA检测方法及应用价值

第二军医大学长征医院 缪晓辉 赵克开

细胞外乙型肝炎病毒DNA是一种松弛环状的双链DNA (relaxed circular DNA, rcDNA) 分子, 其两条链均不是闭合的, 其中负链较长, 约3200个碱基, 含有乙肝病毒基因组的全长基因, 在其5'起始端与3'末端之间有一个数个碱基的“缺刻”(nick); 正链较短, 有较大的“缺口”(gap), 其3'末端不固定, 故长度是可变的, 约为负链长度的50%~100%。在乙肝病毒的复制过程中, 病毒DNA进入宿主细胞核, 在DNA聚合酶的作用下, 两条链的缺口均被补齐, 形成超螺旋的共价、闭合、环状DNA分子

(covalently closed circular DNA, cccDNA)。cccDNA是乙肝病毒前基因组RNA复制的原始模板, 虽然其含量较少, 每个肝细胞内只有约5~50个拷贝, 但对乙肝病毒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, 才能彻底消除乙肝患者病毒携带状态, 是抗病毒治疗的目标。

## 1. 乙肝病毒cccDNA的检测方法

cccDNA和rcDNA在结构和理化特性上有三点不同: ①rcDNA在正链与负链上均有缺口或缺刻, 只是部分区域互补故能形成环状结构, 但非超螺旋结构; 而cccDNA两条链均是完整的, 二者共价互补, 形成超螺旋结构。②rcDNA能与蛋白质共价结合, cccDNA则不能。③由于缺口或缺刻的存在, rcDNA可以被一些核酸酶如外切核酸酶III(exonuclease III)、绿豆核酸酶(mung bean nuclease)等降解成寡核苷酸或单核苷酸, 而cccDNA则由于是超螺旋且双链结构均是完整的, 一般不会被上述酶降解。上述差异是设计和建立cccDNA检测技术的基础。本文就有关cccDNA 常用检测方法作简要介绍。

## 1.1 细胞内cccDNA的抽提与纯化

最常用的抽提细胞内cccDNA的方法是蛋白质一去污剂沉淀法, 其原理是基于rcDNA和cccDNA与蛋白质结合能力的差异。rcDNA能与蛋白质共价结合, 与绝大多数细胞染色体DNA一起形成沉淀, 而cccDNA不能与蛋白质结合故游离于上清中, 用酚氯仿抽提上清即可得到cccDNA。根据笔者的经验, 该方法的主要缺点是: 抽提较为费时, 一般需要4~5小时; 酚氯仿抽提环节多、得率不高; 对于冻存的富集细胞(pellet)难以充分裂解, 单裂解这一步可能需要3~4小时甚至更长时间。此外, 在上清中实际仍然含有少量的rcDNA, 而在沉淀中实际上也存在着一部分cccDNA。

为进一步分离cccDNA、rcDNA和单链DNA, 可以对抽提产物进行纯化。以酶切法最为常用。外切核酸酶III是一种3'→5'外切酶, 对带有钝端、5'突出端或缺口的双链具有特异性, 而不能降解带有3'突出端(至少4个碱基)的双链DNA。绿豆核酸酶则以内切方式降解单链DNA或RNA, 而保持双链DNA的完整性(二者的比活性>1000), 可用于选择性切除双链DNA的突出单链末端, 以及切除单链DNA或RNA。也可单用绿豆核酸酶酶切rcDNA, 或先用外切核酸酶III将rcDNA降解成单链, 然后再用绿豆核酸酶酶切。该方法也有其缺点: 如抽提产物被稀释, 降低了检测敏感度; 绿豆核酸酶的反应缓冲液对PCR反应有抑制作用等。

我们尝试用小量质粒抽提试剂盒抽提去抽提HepG2.15细胞内的cccDNA, 结果发现得率比上述所用方法均要高, 操作也简便, 所有操作在30分钟内就可完成。

## 1.2 cccDNA的定性检测

既往绝大多数文献报道的是用Southern blot对cccDNA进行定性检测, 该方法是分子生物学的经典方法, 但技术要求较高, 敏感度低。

近年来, 也有较多文献报道用PCR技术对cccDNA进行检测。但是, 由于PCR技术灵敏度极高, rcDNA和cccDNA的序列又具有高度的同源性, 因此在使用PCR技术检测cccDNA时, 必须确保只能扩增

cccDNA而rcDNA不被扩增。目前利用rcDNA和cccDNA结构上的差异可以解决这一问题。由于rcDNA的正链和负链上均存在缺口，故可以设计跨越两个缺口的引物，使rcDNA不会被扩增，而cccDNA由于是完整的双链结构则可以被选择性扩增。同时可设计另一对不跨越缺口的引物或只跨越一条链的缺口的引物同时检测cccDNA和rcDNA[图1]。Kock等成功地用这种选择性PCR的方法在检测感染细胞内的cccDNA和rcDNA。

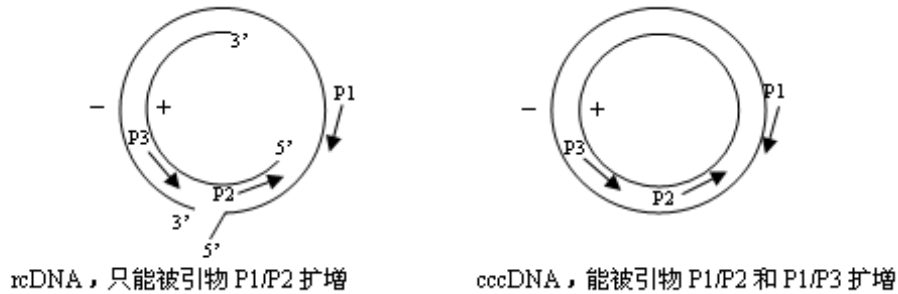


图1 选择性 PCR 检测 cccDNA

此外，为进一步提高检测的灵敏度，可用套式PCR(nested PCR)的方法。

但是有报道认为跨缺口引物对两种DNA的选择性不是绝对的，在PCR检测cccDNA时，起始模板量不能过高，否则rcDNA也有可能被扩增，Kock等发现每个PCR反应管中HBV DNA的量在1 pg（约 $6 \times 10^5$ 拷贝）时能达到最佳的灵敏度与选择性，因此在分析前应估计标本中HBV DNA的量。虽然套式PCR更为灵敏，但由于需取PCR产物进行再次扩增，因此在操作中要注意防止PCR产物污染，避免假阳性。

### 1.3 cccDNA的定量检测

在定性检测的基础上，可以进一步对cccDNA进行定量检测。仍以PCR定量分析技术中，尤其是竞争PCR技术的敏感性和精确度高。方法是在PCR反应管中加入一种已知量的、能与野生模板等效扩增的内参照，内参照是经过突变处理的，其两端尤其是引物退火区的序列与野生模板相同。PCR扩增后通过一定的方法将野生片段与突变片段区分开，分别计算其绝对量，或求出其相对比值，就可以推算PCR扩增以前野生模板的量。

He等建立了实时荧光定量PCR检测cccDNA的方法。他们将Taqman MGB探针设计在负链缺刻的下游，与负链互补结合。对cccDNA，在上游引物的引导下，Taq酶到达Taqman MGB探针所结合的部位，利用其5'→3'外切活性将探针切断，3'端的淬灭基团失去对5'端的发光基团的抑制作用，从而产生荧光信号。每扩增一个cccDNA分子，就会产生一个荧光信号，PCR仪可对产生的信号进行实时监测，根据荧光信号的强弱对cccDNA进行定量。对rcDNA，由于上游引物引发的链延伸不能通过负链缺刻，故不能使Taqman MGB探针被Taq酶切断产生荧光信号。该方法的特异性比选择性PCR进一步提高，可以消除高rcDNA背景可能产生的非特异性扩增。该方法的检测下限可达100个拷贝，灵敏度比目前应用的任何一种其它方法都高。所有检测在2小时内可完成。

还有其他一些更为敏感的检测方法，如Shao等报告的两步法对cccDNA进行实时荧光定量。其设计与He等的方法有异曲同工之处，即都是利用rcDNA与cccDNA分子结构上是否完整来有效地将二者区分开来，实现对cccDNA的特异性检测。该方法在荧光探针位置的选择上更符合荧光PCR的要求，即探针越靠近引物效果越好，这样检测到的荧光信号质量和实时扩增曲线形状可能更佳，而在He等的方法中探针与上游引物点之间的距离则至少需要在230个碱基以上。但是，该方法存在与套式PCR类似的缺点，即需要分两步操作，单链延伸反应管开盖后极有可能造成产物污染。

## 2. 乙肝病毒cccDNA检测的临床意义

### 2.1 评价抗乙肝病毒药物的新指标

目前临床上评价干扰素、核苷类似物这些抗乙肝病毒药物时存在一个很大的问题，即其评价指标主要是肝功能的改善与否、血清乙肝病毒DNA水平的变化以及肝组织的病理学改变等。诚然，这些指标对临床医生判断患者病情而言非常重要和实用，也是临床医生选用抗乙肝病毒药物时的依据，然而对于何时停用抗病毒药物、停用抗病毒药物后乙肝病毒是否会重新复制活跃导致乙肝复发则缺乏客观而有效的指标。开展肝细胞内乙肝病毒cccDNA的动态的定量监测可以部分解决这个问题。治疗前后肝细胞内乙肝病毒cccDNA的含量的变化应该纳入到抗乙肝病毒药物评价的指标体系中来，从一定意义上说，只有能够彻底清除乙肝病毒cccDNA的药物，才能算是真正“有效”的抗病毒药物。

Schultz等用鸭干扰素- $\gamma$ (DuIFN- $\gamma$ )分别在DHBV感染前后作用于原代培养鸭肝细胞，发现100 U/ml的DuIFN- $\gamma$ 可使细胞内cccDNA水平下降至1/10~1/20。在DHBV感染前1天加DuIFN- $\gamma$ ，感染后4天细胞内仍然可以检测到cccDNA，但仅相当于不加药对照组感染后1天的水平，说明在DuIFN- $\gamma$ 作用

下,新感染病毒的rcDNA仍然可以转化为cccDNA,但子代rcDNA通过细胞内通路扩增形成cccDNA的过程受到抑制。Mason等以拉米夫定治疗WHV感染的土拨鼠,结果发现可使血清病毒的滴度下降至初始水平的0.3%甚至更多,但在维持治疗3~12个月后,95%的土拨鼠肝脏细胞中仍然能检测到病毒,cccDNA水平无明显改变,但有3只土拨鼠感染肝细胞的比率和肝细胞内cccDNA的水平有显著下降(给药组2只,对照组1只),作者认为这可能是免疫清除的结果而非药物的作用。Dandri等[15]以不同剂量(1 $\mu$ mol/L、10 $\mu$ mol/L、100 $\mu$ mol/L)的阿德福韦(adefovir)作用于原代培养的WHV感染土拨鼠肝细胞,发现均可使WHVDNA合成下降90%,病毒颗粒的分泌量下降98%,但对cccDNA的合成没有影响,对包膜蛋白的分泌和RNA的合成无作用。即使在培养基中加入表皮生长因子作用14天以诱导细胞转化(turnover)发生分裂,但细胞内cccDNA水平仍无变化,提示cccDNA可被从母代细胞转运到分裂形成的子代肝细胞中。L-Fd4C(2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-beta-L-5-fluorocytidine)是近年来发现和研究较多的核苷类抗病毒药物,其体外抗病毒活性至少较拉米夫定强10倍。Zoulim等用Fd4C作用于原代培养的鸭肝细胞,发现它对逆转录酶的抑制作用强于拉米夫定等其它胞苷类似物,具有持久的抑制病毒复制的作用,但对cccDNA的水平没有影响。当用Fd4C处理病毒感染的鸭和土拨鼠时,对病毒血症和DNA的合成也强于拉米夫定,但是停药后很快复发,因为cccDNA在肝细胞内持续存在。上述结果均说明,尽管核苷类药可以抑制HBV DNA复制,但不能清除cccDNA。

除干扰素和核苷类似物外,也有人研究了其他药物对cccDNA的影响。Turin等用细胞周期阻断剂丁酸钠作用于体外培养的鸭肝细胞。丁酸钠是一种细胞分裂抑制剂,能可逆地将细胞周期阻断于G0/G1期。他们发现虽然它不能阻止起始的病毒基因组转变为cccDNA,但可以抑制随后的cccDNA扩增。但这种作用是可逆的,一旦撤除丁酸钠,cccDNA水平又将上升。Thermet等用包含DHBV大包膜蛋白基因的质粒作为治疗性DNA疫苗治疗慢性携带DHBV的鸭,发现可以显著减少病毒的复制,更有意义的是,在一些鸭(7/30)的肝细胞内,cccDNA已被完全清除。治疗性DNA疫苗也许是一种清除HBV感染肝细胞内的cccDNA、减少复发的有前景的方法。其它旨在阻断病毒在细胞内复制、转录、翻译乃至释放的某一个环节的抗病毒药物则很难清除cccDNA,因为cccDNA池已经在感染肝细胞内形成,而肝细胞是相当稳定的几乎不分裂的细胞,即使肝细胞发生分裂,cccDNA还可以被分配到子代细胞中去,并通过负反馈调节机制最终保持稳定。

## 2.2 评价抗乙型肝炎病毒是否能感染肝外组织的客观指标之一

乙型肝炎病毒不仅仅是一种嗜肝病毒,一些肝外组织中也可检测到乙型肝炎病毒DNA,如肾脏、胰腺以及外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)等。早就有人发现乙型肝炎病毒可以感染白细胞,而这种免疫细胞的感染似乎有利于病毒逃避免疫反应,从而导致机体清除乙型肝炎病毒的能力下降。关于PBMC能否被乙型肝炎病毒感染的问题目前仍有争议,其中一个重要的原因是没有确立PBMC被感染的标准。我们认为把PBMC细胞内是否存在cccDNA作为判断感染的标准是最可靠的。cccDNA的形成是乙型肝炎病毒的侵入细胞后在细胞内进行复制的起始步骤,也是转录合成前基因组RNA(pregenomic RNA,pgRNA)的前体,是建立病毒感染状态的最重要标志,没有cccDNA的形成也就没有其后的一系列过程。Kock等用乙型肝炎病毒去感染体外培养的PBMCs时,发现不能在细胞内检测到cccDNA,相反,如果感染的是肝细胞,则非常容易检测到cccDNA。此外,在乙肝患者的肝组织内,能检测到cccDNA和rcDNA,而在其PBMC中,则只能检测到rcDNA。认为乙型肝炎病毒是不能感染PBMC,即使PBMC中检测到乙型肝炎病毒,也只是血液的病毒DNA与PBMC表面牢固结合,不易被PBS等洗涤下来,抽提细胞所得到的病毒DNA其实并不存在于细胞内;或病毒仅仅是被PBMC所“吸收”(absorption),并没有建立真正意义上的感染状态。这一实验结果给我们很多启发,也加深了对乙型肝炎病毒感染的认识。

## 2.3 评价乙肝患者病情

我们用选择性荧光定量PCR对93例乙肝患者血清作回顾性分析时,发现24例患者血清cccDNA呈阳性,其中急性乙肝1例,慢性乙肝(轻度)6例,慢性乙肝(中度)6例,慢性乙肝(重度)3例,肝炎肝硬化2例,慢性乙肝(重型)6例,其中慢性乙肝(中度)以上的病例占70%以上。虽然经过统计学分析还不能看出显著差异,样本量还不够大,血清cccDNA阳性与病情的轻重是否存在某种关系还有待于进一步的深入研究。但是,从理论上推测,既然存在于肝细胞胞质和线粒体中的转氨酶等酶类在肝细胞被破坏时能释放到血液中,那么存在于肝细胞核内的cccDNA分子在肝细胞变性、坏死时应该也可以释放到血液中,而且病情越严重,变性坏死的细胞越多,对于同一个患者而言,在某一时间段内,其血液中的cccDNA水平应该也相应地越高,对判断病情有意义。目前通过肝活检来监测乙肝患者肝组织中的cccDNA水平变化存在着一定困难,因而监测血液中的cccDNA的动态变化也许更具有现实意义。当然,其中还存在一些问题有待研究和解决,比如血液中的cccDNA水平远远低于肝组织中的cccDNA水平,也远远低于血液中的rcDNA水平,因此必须进一步提高cccDNA定量检测的灵敏度。

## 3. 展望

目前看,我们对HBV cccDNA的认识有待提高。在检测技术上有许多问题需要解决,比如,如何进一步提高灵敏度,如何避免rcDNA同时被扩增(国内有些文献报告的结果可能忽视了这一问题),如何

简化操作步骤，从而能够被广泛应用等。检测或监测cccDNA的临床意义也有待挖掘，比如，可以通过细胞和动物模型，来评判新药的抗病毒作用；HBV感染基础上发生的肝衰竭，其病期、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；基因治疗或免疫治疗的“靶向”可以定位于cccDNA；cccDNA对肝细胞染色体是否起中用值得探索，这对阐述肝细胞癌变的发生机制可能有益。



MEDCyber

EURO RSCG LIFE

MEDCyber  
reports

栏目说明：本栏目由 MEDcyber 负责编辑，所发表文章不代表 MEDcyber 观点

主办单位：中华医学会感染病学分会与肝病学会

医学空间 灵机营销咨询（上海）有限公司 版权所有

The Sales Machine Consultant Co. Ltd. 1999-2005 All Right Reserved.