

慢性乙型肝炎患者肝细胞 HBV cccDNA、tDNA 及 HBV 表面标志物的相关性研究

李华东 江建宁 陆晖 韩晓群 周海兰 吴霜 苏明华

【摘要】 目的 回顾性分析慢性 HBV 感染者肝细胞内 HBV ccc DNA 含量与肝细胞 tDNA、HBsAg、HBcAg 的关系以及临床意义。**方法** 应用荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测未经抗病毒治疗的患者 58 例(未抗病毒组)、经抗病毒治疗的慢性乙型肝炎患者 4 例(抗病毒组)的肝细胞 HBV ccc DNA 和 tDNA 含量,应用免疫组化法定性检测肝组织内 HBsAg 和 HBcAg 表达,用 SPSS 13.0 软件统计分析肝细胞 HBV ccc DNA 含量、tDNA、HBsAg、HBcAg 间的关系。**结果** 肝细胞 HBV ccc DNA、HBV tDNA 含量与 HBsAg、HBcAg 在肝细胞中的表达模式间差异无统计学意义($P > 0.05$)。肝细胞内 HBV cccDNA 含量与 HBV tDNA 含量呈高度正相关($P < 0.01$)。慢性乙型肝炎抗病毒治疗患者中,疗程 > 2 年并达到《病毒性肝炎防治方案》停药标准,肝细胞内 ccc DNA、tDNA 含量较未抗病毒组显著降低,但肝细胞内仍然可以检出 HBV ccc DNA、tDNA。**结论** 肝细胞 HBV ccc DNA 含量与 HBsAg、HBcAg 在肝细胞的表达模式间无一定规律性。核苷(酸)类似物抗病毒治疗 2~3 年并不能完全清除肝细胞内 HBV ccc DNA。

【关键词】 肝炎,乙型,慢性;ccc DNA;荧光定量 PCR;肝炎病毒表面抗原,乙型;肝炎病毒 c 抗原,乙型;肝炎病毒 e 抗原,乙型;免疫组织化学

The correlation of HBV ccc DNA and tDNA, HBV maker in the hepatocytes of chronic hepatitis B patients LI Hua-dong, JIANG Jian-ning, LU Hui, HAN Xiao-qun, ZHOU Hai-lan, WU Shuang, SU Ming-hua. The First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China
Corresponding author: JIANG Jian-ning, Email: jjianning@163.com

【Abstract】 Objective The correlation between the quantity of HBV ccc DNA and tDNA, HBsAg, HBcAg in the hepatocytes of chronic hepatitis B patients and the clinical significance were analyzed, retrospectively. **Methods** Patients in this study were divided into two groups: nonantiviral therapy group (58 cases), antiviral group (4 patients with chronic hepatitis B after nucleos(t)ide therapy). The quantity of HBV ccc DNA and tDNA in the hepatocytes of the two groups were detected by FQ-PCR, the levels of HBsAg, HBcAg in the hepatocytes were identified by immunohistochemistry. The correlation between quantity of HBV ccc DNA and tDNA, HBsAg, HBcAg in the hepatocytes of chronic hepatitis B patients were analyzed by SPSS 13.0 software. **Results** There were no significant difference between the quantity of HBV ccc DNA, tDNA in the hepatocytes and the expressive mode of HBsAg, HBcAg ($P > 0.05$). There was a significant positive correlation between the quantity of HBV ccc DNA and HBV tDNA in the hepatocytes ($P < 0.01$). Patients accepted nucleos(t)ide analogue therapy over 2 years and reached the criteria of therapy endpoint in China guideline for hepatitis B patients. The quantity of HBV ccc DNA and tDNA in the hepatocytes were lower than that of the patients without antiviral therapy, but the HBV ccc DNA and tDNA in the hepatocytes could be detected yet. **Conclusions** There were no regularity between the quantity of HBV ccc DNA, tDNA in the hepatocytes and the expressive mode of HBsAg, HBcAg. HBV ccc DNA in the hepatocytes could not be cleared completely through nucleoside analogue therapy for 2-3 years.

【Key words】 Chronic hepatitis B; Covalently closed circular DNA; Fluorescence quantitative PCR; HBsAg; HBcAg; HBeAg; Immunohistochemistry

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.04.009

基金项目:广西自然科学基金(No. 2010GXNSFD013046, No. 桂科自 0832117, No. 桂科自 0542092, No. 桂科青 0832037);广西医学科学实验中心开放基金资助项目(No. KFJJ2010-20)

作者单位:530021 南宁市,广西医科大学第一附属医院(李华东、江建宁、苏明华);武汉市医疗救治中心(李华东、韩晓群、周海兰、吴霜);解放军 303 医院感染科(陆晖)

通讯作者:江建宁, Email: jjianning@163.com

乙型肝炎病毒(HBV)属嗜肝脱氧核糖核酸科,不完全双链 DNA 病毒,与其他 DNA 病毒相比,不同之处在于其特殊的复制中间体即共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, ccc DNA) 的存在。ccc DNA 的存在是病毒复制的重要标志,是病毒感染得以维持的根源,抑制或清除 ccc DNA 是治疗慢性乙型肝炎的关键之一^[1]。本研究应用荧光定量 PCR(FQ-PCR)技术特异性检测慢性 HBV 感染者肝细胞内 ccc DNA 含量,分析肝细胞内 HBV ccc DNA 含量与 tDNA、HBsAg、HBcAg 表达的关系,进而研究慢性乙型肝炎患者 HBV 在体内复制的动力学改变及抗病毒治疗效果。

资料与方法

一、研究对象

1. 纳入和排除标准:慢性乙型肝炎和乙型肝炎肝硬化合并肝癌患者的诊断标准符合 2000 年西安修订的《病毒性肝炎防治方案》的诊断标准^[2]。排除合并糖尿病、甲状腺功能亢进症、HIV 感染、自身免疫性疾病及其他肝炎病毒感染者。

2. 一般资料:肝组织标本来源于广西医科大学第一附属医院肝胆外科和感染科住院和门诊患者。所有患者均签署知情同意书,其中未经抗病毒治疗组患者 58 例(其中行肝组织活检的慢性乙型肝炎患者 28 例,取癌旁肝组织的乙型肝炎肝硬化合并肝癌手术切除患者 30 例),男性 49 例,女性 9 例;年龄 16~72 岁,平均年龄 40.88 岁,其中血清 HBV DNA $<1.0 \times 10^3$ 拷贝/ml 者 12 例。抗病毒治疗组患者 4 例(均为慢性乙型肝炎患者),均为男性,年龄 28~53 岁,平均年龄 37.25 岁,该组患者给予拉米夫定和(或)阿德福韦酯进行抗病毒治疗,并已经达到《病毒性肝炎防治方案》规定的停药标准,疗程为 2~3 年。

二、检测方法

1. HBV DNA 的提取:应用上海华舜生物有限公司生产的滤柱式小量组织 DNA 提取试剂盒(编号:w6501)抽提 62 例慢性乙型肝炎患者的肝组织 HBV DNA,用紫外分光仪检测 DNA 的纯度和浓度。DNA 的纯度 A_{260}/A_{280} 须介于 1.6~1.8 之间,如 $A_{260}/A_{280} \leq 1.6$,则提示含较多蛋白质,须再抽提。

2. 肝细胞内 ccc DNA 的荧光定量 PCR 定量检测:取肝组织 DNA 提取液 10 μ l,用 25 单位 ATP-依赖的 DNA 酶消化掉含有单链 DNA 区的 rc DNA 及其他单链 DNA,以排除干扰。然后,取酶消化终产物 2 μ l,加入 23 μ l 反应体系中,共 25 μ l,经振荡离心后,置于 Opticon2 PCR 仪器中,反应条件为:95℃

10 min 预变性并激活 Taq 酶;95℃ 10 s,54℃ 20 s,72℃ 25 s,共 45 个循环。

3. HBV tDNA 基因定量检测:分别取未被 ATP 依赖 DNA 酶消化的肝组织 DNA 提取液 2 μ l,用来定量检测肝细胞内 HBV tDNA 基因,检测步骤与 HBV ccc DNA 的检测基本相同。以 β -actin 为内参照,计算出每个肝细胞内 HBV ccc DNA、tDNA 的拷贝数。

4. 肝细胞内 HBsAg、HBcAg 表达的检测:肝细胞内 HBsAg、HBcAg 表达检测用 SupervisionTM 二步法免疫组化检测,一抗为兔抗人多克隆抗体,由武汉博士德试剂公司提供,二抗为 SupervisionTM 兔-HRP 检测系统,二抗及 DAB 酶底物显色试剂盒购自上海长岛生物技术有限公司,由实验中心检测完成。

三、统计学处理

应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,两变量均是正态分布、方差齐用 t 检验和直线相关分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 描述;偏态分布采用非参数秩和检验和秩相关分析,数据以中位数(四分位间距)[$M(Q)$]描述,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、肝细胞 HBV ccc DNA、tDNA 含量与 HBsAg、HBcAg 表达模式的关系

研究结果显示 HBsAg、HBcAg 在肝细胞中不同表达模式间肝细胞 HBV tDNA 和 HBV ccc DNA 水平均无显著性差异($P > 0.05$),见表 1。

表 1 肝细胞 HBsAg、HBcAg 不同表达模式间 HBV tDNA 和 HBV ccc DNA 含量的比较(拷贝/cell)

表达模式	例数	tDNA	ccc DNA
HBsAg ⁺ HBcAg ⁺	15	49.26(131.94)	5.58(40.25)
HBsAg ⁺ HBcAg ⁻	36	13.21(58.94)	2.54(8.03)
HBsAg ⁻ HBcAg ⁻	7	0.96(13.20)	2.17(5.18)
H		4.116	4.396
P		0.128	0.111

注:数值表示方法: $M(Q)$

二、肝细胞内 HBV ccc DNA 含量与肝细胞内 HBV tDNA 含量相关性分析

本研究结果显示肝细胞内 HBV ccc DNA 含量[1.80(8.44)]拷贝/cell 与 HBV tDNA 含量[13.08(72.16)]拷贝/cell 呈高度正相关($r = 0.881, P = 0.00$)。

三、4 例抗病毒与 12 例未抗病毒治疗患者体内病毒标志物表达水平

本研究结果显示,慢性乙型肝炎患者行抗病毒治疗 2~3 年并达到停药标准后,其肝细胞内 ccc DNA、

tDNA 含量及血清 HBsAg、HBcAg 水平均值较未抗病毒组均显著下降,但抗病毒治疗患者肝细胞内仍然可检出低载量的 HBV ccc DNA 和 tDNA。由于两组样本例数较少,故未进行统计分析,见表 2~3。

讨 论

HBV ccc DNA 是 HBV 基因组复制的重要中间体,其形成是 HBV 生活周期中关键的一步。研究发现,在每个肝细胞中保持约 30~50 拷贝的 ccc DNA^[3],HBV ccc DNA 与细胞核内的核蛋白结合形成微染色体^[4],其不对称复制可保护 HBV ccc DNA 不被直接清除,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 ccc DNA 池^[5]。目前临床应用的抗 HBV 核苷(酸)类似药物短期内不能清除 ccc DNA,其对 ccc DNA 无直接作用,HBV ccc DNA 池持续存在于肝细胞核内,是造成抗病毒药物治疗停药后复发的根源。因此,ccc DNA 成为慢性乙型肝炎治疗中的关键所在^[6],只有彻底耗竭肝细胞核内的 HBV ccc DNA,才能彻底治愈慢性乙型肝炎。

肝细胞内的 HBsAg、HBcAg 是 HBV 感染和复制的特征标志,关于 HBV DNA 与肝组织 HBsAg、HBcAg 水平的关系,国内外报道^[7-9]主要是对血清 HBV DNA 与肝组织 HBsAg、HBcAg 的关系研究,至于肝细胞中的 HBV ccc DNA 与 HBsAg、HBcAg 的关系报道很少。本研究应用特异强、敏感性高的荧光定量 PCR 法检测 58 例乙型肝炎患者肝细胞内 HBV ccc DNA、HBV tDNA 含量及免疫组化法检测肝细胞内 HBsAg 和 HBcAg 表达情况,结果显示三种表达模式的肝细胞 HBV ccc DNA、HBV tDNA 水平间没有明显差别,提示肝细胞内 HBsAg 和 HBcAg 表达模式并不能反映肝细胞内 ccc DNA、tDNA 水平的高

低。本研究对于肝细胞内 HBsAg 和 HBcAg 只是定性检测,未行定量检测,可能影响了其可比性,肝细胞内 HBsAg 和 HBcAg 形成后,是很快的组装成病毒颗粒逸出,还是滞留在肝细胞内尚不明确,关于此方面研究还有待进一步深入。

肝细胞内 HBV ccc DNA 和 tDNA 是诊断 HBV 感染的可靠指标^[10],二者水平的高低能够直接反映病毒复制能力。Wong 等^[11]对 16 例 HBeAg 阳性和 36 例抗-HBe 阳性的乙型肝炎患者肝组织的 HBV DNA 和 HBV ccc DNA 的水平研究发现,肝组织 HBV ccc DNA 水平与肝组织 HBV tDNA 水平呈显著正相关。本研究结果显示肝细胞内 HBV ccc DNA 水平与肝细胞内 HBV tDNA 水平呈高度正相关($P < 0.01$),同文献报道结果一致。肝细胞内 HBV ccc DNA 是 tDNA 一种存在形式,通过 ccc DNA 不断复制来补充肝细胞内 tDNA,因此肝细胞 ccc DNA 与 tDNA 存在一定关系。

目前,临床检测肝细胞内 ccc DNA、tDNA 的最终目的是评价抗病毒治疗效果、判断停药时间来指导临床用药。有研究发现核苷(酸)类似物抗病毒治疗可以使肝组织 HBV ccc DNA 水平显著下降^[12-13]。本研究对抗病毒治疗组 4 例患者(已达到停药标准)体内 HBV 复制情况研究发现其肝细胞 HBV ccc DNA、tDNA 和血清 HBV DNA、HBsAg 水平均偏低,并且显著低于未经抗病毒治疗且血清 HBV DNA $< 10^3$ 拷贝/ml 的慢性乙型肝炎患者。本研究抗病毒治疗组中 1 例患者经拉米夫定治疗 2 年后出现 HBsAg 转阴,但是其肝组织内仍可检测到 5.61 拷贝/cell 的 HBV ccc DNA,提示应用核苷治疗类似药物抗病毒治疗 2~3 年并未完全清除 ccc DNA。

表 2 4 例经抗病毒治疗的慢性乙型肝炎患者 HBV 标志物及表达水平

患者	肝内 HBV S 和 C 抗原	血清 HBV DNA (拷贝/ μ l)	肝内 tDNA (拷贝/cell)	肝内 ccc DNA (拷贝/cell)
1	S(+), C(-)	$< 1.0 \times 10^3$	11.91	6.19
2	S(+), C(-)	$< 1.0 \times 10^3$	30.86	5.14
3	S(+), C(-)	$< 1.0 \times 10^3$	16.33	5.61
4	S(+), C(-)	$< 1.0 \times 10^3$	3.63	1.34

表 3 抗病毒治疗组与未抗病毒治疗组患者 HBV 标志物的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	肝内 ccc DNA (拷贝/cell)	肝内 tDNA (拷贝/cell)	血清 HBsAg (mIU/ml)	血清 HBeAg (PEI U/ml)
抗病毒治疗组	4	4.57 ± 2.20	15.68 ± 11.41	72.36 ± 96.51	0
未抗病毒治疗组	12	11.66 ± 18.26	172.79 ± 410.65	188.32 ± 105.44	0.0025 ± 0.0062

注:入选的未抗病毒治疗组的 12 例患者均血清 HBV DNA $< 1.0 \times 10^3$ 拷贝/ml

尽管核苷(酸)类似物只能抑制病毒的复制,不能直接清除肝细胞核内 HBV ccc DNA,但是其作用靶点是肝细胞核外松弛环状 DNA,能够抑制其合成,随着时间延长,肝内 ccc DNA 来源减少甚至可以消失,当病毒复制速度极慢,且低于肝细胞的生命周期时,HBV ccc DNA 池可能被耗竭。最近研究人员采用数学模型推算得出,应用阿德福韦酯需要 14.5 年才能完全清除慢性乙型肝炎患者肝细胞中的 HBV ccc DNA。

据此,对于慢性乙型肝炎患者,无论是 HBeAg 阳性还是阴性都必须进行长期和规范化的治疗,最大限度地长期应用抗 HBV 药物治疗,直至患者肝细胞内的 ccc DNA 库得不到新的补充而耗竭,从而达到根治疗效。

参 考 文 献

- 1 陈智. 乙型肝炎病毒 ccc DNA 研究现状. 中华传染病杂志, 2003, 21(1): 8-10.
- 2 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 肝脏, 2000, 5(4): 257-263.
- 3 Jun-Bin S, Zhi C, Wei-Qin N, et al. A quantitative method to detect HBV cccDNA by chimeric primer and real-time polymerase chain reaction. J Virol Methods, 2003, 11(2): 45-52.
- 4 Zoulim F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. J Hepatology, 2005, 42(3): 302-308.
- 5 Torii N, Hasegawa K, Joh R, et al. 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(3): 234-243.
- 6 Zoulim F. Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection. Antiviral Res, 2004, 64(1): 1-15.
- 7 Omaram M. Correlation of hepatitis B virus DNA and antigens in the liver. Gastroenterology, 1987, 92(1): 192-196.
- 8 周文红. 慢性乙型肝炎患者肝组织 HBsAg、HBeAg 表达及临床意义. 中西医结合肝病杂志, 2006, 16(5): 266-267.
- 9 王功遂, 王蔓芝, 谢秋里, 等. HBsAg、HBeAg 在慢性乙型肝炎肝细胞内的表达及临床意义. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(5): 287-289.
- 10 Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigensubtypes. Gen Virol, 1988, 69(10): 2575-2583.
- 11 Wong DK, Yuen MF, Yuan H, et al. Quantitation of covalently closed circular Hepatitis B virus DNA in Chronic Hepatitis B patients. Hepatology, 2004, 40(3): 727-737.
- 12 Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, et al. Persistence of ccc DNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. Gastroenterology, 2004, 126(7): 1750-1758.
- 13 Maynard M, Parvaz P, Durantel S, et al. Sustained HBs seroconversion during lamivudine and adefovir dipovoxil combination therapy for lamivudine failure. J Hepatol, 2005, 42(2): 279-281.

(收稿日期: 2011-11-05)

(本文编辑: 孙荣华)

李华东, 江建宁, 陆晖, 等. 慢性乙型肝炎患者肝细胞 HBV cccDNA、tDNA 及 HBV 表面标志物的相关性研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2012, 6(4): 300-303.