·临床论著·

慢性乙型肝炎患者肝细胞HBV ccc DNA与血清HBV DNA及肝纤维化程度的相关性

刘惠媛 廖宝林 李凌华 邓浩辉 陈志敏 向芳菲 林思炜 石裕明

【摘要】 目的 探讨慢性乙型肝炎（CHB）患者肝细胞HBV ccc DNA含量与血清HBV DNA、肝组织纤维化程度的相关性及在抗病毒治疗中的临床意义。**方法** 对48例未接受抗病毒治疗CHB患者（A组）和6例经聚乙二醇化干扰素α-2a规律抗病毒治疗48周CHB患者（B组）进行肝组织活检以检测肝纤维化分期，并应用real time-PCR检测肝细胞HBV ccc DNA含量。分析A组患者肝细胞HBV ccc DNA与肝纤维化程度以及两组患者肝细胞HBV ccc DNA与血清HBV DNA相关性，分析B组患者HBV ccc DNA变化。**结果** 肝细胞cccDNA及血清DNA水平均与肝组织纤维化程度呈负相关，但HBV ccc DNA相关性更强（r = －0.465，P = 0.008）。肝细胞HBV ccc DNA与血清HBV DNA不存在相关性（r = 0.057， P = 0.418）。B组患者肝细胞HBV ccc DNA较对照组（自A组中选取性别、年龄及HBV DNA无差异患者共12例）显著下降，其中3例患者血清HBV DNA载量低于检测下限，但肝细胞仍可检出HBV ccc DNA。**结论** 肝细胞HBV ccc DNA与肝纤维程度呈负相关，而血清HBV DNA水平不能反映肝内病毒复制的程度。CHB患者抗病毒治疗需要长期进行才可能完全清除肝细胞内HBV ccc DNA。

【关键词】 肝炎，乙型，慢性；ccc DNA；DNA；肝纤维化

Relationships among HBV ccc DNA in hepatocytes and HBV DNA in serum, severity of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B

LIU Hui-yuan, LIAO Bao-lin, LI Ling-hua, DENG Hao-hui, CHEN Zhi-min, XIANG Fang-fei, LIN Si-wei, SHI Yu-ming. *Institute of Liver Diseases, Guangzhou No. 8 people's Hospital, Guangzhou 510060, China*

Corresponding author: LIU Hui-yuan, Email: huiyuanliu@163.com

【Abstract】 Objective To explore the relationships among levels of HBV ccc DNA in hepatocytes, HBV DNA in serum and severity of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B (CHB), and investigate its clinical significance in antiviral therapy. **Methods** There were two groups of patients: group A were CHB patients who did not accept any antiviral therapy before (n = 48); group B were CHB patients who received antiviral treatment with peginterferon alpha-2a for 48 weeks (n = 6). All patients had done liver biopsies to determine the severity of liver fibrosis and measured levels of HBV ccc DNA in hepatocytes by real time-PCR. The relationships between levels of HBV ccc DNA in hepatocytes and severity of liver fibrosis in group A, and between levels of HBV ccc DNA in hepatocytes and HBV DNA in serum in both groups were analyzed. Changes of HBV ccc DNA level in hepatocytes were investigated in group B. **Results** Both levels of HBV ccc DNA in hepatocytes and HBV DNA in serum were negatively correlated with severity of liver fibrosis, while HBV ccc DNA with more significant relationship (r = －0.465, P = 0.008). Levels of HBV ccc DNA in hepatocytes were not correlated with HBV DNA in serum (r = 0.057, P = 0.418). Levels of HBV ccc DNA and HBV DNA in patients who received antiviral therapy from group B were significantly decreased compared to the control group (12 patients matched with sex, age and level of HBV DNA from group A). Total of 3 patients' levels of HBV DNA in serum could not be detected, but HBV ccc DNA

DOI：10.3877/cma.j.issn.1674-1358. 2013. 03. 008
基金项目：广东省医学科学技术研究基金（No. A2011494）；广东省药学会肝炎用药研究基金（No. 2011G05）；广州市医药卫生科技项目（No. A201102A213193）
作者单位：510060 广州市，广州市第八人民医院（刘惠媛、廖宝林、李凌华、邓浩辉、陈志敏、向芳菲、石裕明）；广州市越秀区中医医院（林思炜）
通讯作者：刘惠媛，Email：huiyuanliu@163.com

still existed in hepatocytes. **Conclusions** Levels of HBV ccc DNA in hepatocytes are negatively correlated with severity of liver fibrosis, but levels of HBV DNA in serum could not reflect the replication of HBV in liver. HBV ccc DNA in hepatocytes could not be cleared completely until antiviral therapy for a long term in patients with CHB.

【Key words】 Chronic hepatitis B; Covalently closed circular DNA; DNA; Liver fibrosis

乙型肝炎病毒（hepatitis B virus，HBV）为部分双链环状DNA病毒，而共价闭合环状DNA（covalently closed circular DNA，ccc DNA）是HBV复制中间体，亦是其mRNA和前基因组RNA合成模板，为复制重要标志。ccc DNA使得HBV感染得以维持，因此抑制或清除HBV ccc DNA是治疗慢性乙型肝炎（chronic hepatitis B，CHB）关键之一[1-2]。近年来，HBV ccc DNA相关研究是医学界重点和热点。本课题组前期研究发现血清HBV DNA水平与肝脏纤维化程度虽呈负相关，但相关系数不高（$r=-0.251$，$P<0.001$）[3]。因此，本研究拟应用real time-PCR（RT-PCR）技术特异性检测CHB患者肝细胞HBV ccc DNA含量，分析肝细胞HBV ccc DNA与血清HBV DNA水平相关性，以及比较两者与肝组织纤维化程度相关性，并探讨患者抗病毒治疗后HBV在体内复制的动力学改变，报道如下。

资料与方法

一、研究对象

选择2011年1月至2012年6月于本院肝病科住院诊治且未曾接受任何抗病毒治疗的48例CHB患者（A组），其中男性35例，女性13例。另选取接受聚乙二醇化干扰素α-2a规律抗病毒治疗48周患者6例（B组），其中HBeAg阳性者4例（男性3例，女性1例），HBeAg阴性2例（男性1例，女性1例），年龄（30 ± 9）岁，同时从A组患者中选取性别、年龄及血清HBV DNA水平无差异的12例患者作为其对照组。入选患者排除甲型、丙型、丁型、戊型肝炎病毒重叠感染以及其他原因（酒精、药物、肿瘤以及自身免疫性肝病等）引起的肝脏损害，并均进行肝组织学病理活检。慢性乙型肝炎参考我国2010年修订的慢性乙型肝炎防治指南诊断标准[4]。所有患者均签署知情同意书。

二、研究方法

1. 血清HBV标志物定量与HBV DNA定量检测：采集患者空腹血5 ml离心后于－20℃冰箱保存。血清HBV DNA水平采用RT-PCR法检测（购自中山大学达安基因股份有限公司），检测下限为500 IU/ml；血清HBV标志物（HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc）用化学发光法定量检测（上海罗氏公司产品）。

2. 肝功能检查：采集患者空腹血5 ml离心后于4℃冰箱保存备用，采用全自动生化仪及其配套试剂检测肝功能（购自日本奥林巴斯公司）。

3. 肝活体组织检查及组织病理学检查方法：肝活体组织检查采用单人操作法，选择16G活组织检查穿刺针，经超声定位后，在右侧腋前线第8肋间常规消毒铺巾，经皮快速穿刺获取肝组织。获取肝组织必须在1.2 cm以上（至少包括3个以上汇管区），标本用4%甲醛溶液固定。取部分肝组织尽快移入液氮中保存备用，剩余肝组织常规制片，HE及网状纤维染色，病理诊断纤维化分期为S_0～S_4，指定一位病理医生最后审核诊断[5]。

4. 实时荧光定量PCR检测肝细胞内HBV ccc DNA：应用QIAamp DNA Mini Kit组织DNA提取试剂盒（德国Qiagen公司），根据说明书提取所有患者肝组织HBV ccc DNA置于－80 ℃冰箱保存。使用PSAD酶（美国Epicentre公司）消化总DNA抽提产物，有效降解松弛环状双链DNA（rcDNA）和线性双链DNA（dlDNA）以增强HBV ccc DNA检测特异性，具体操作按说明书进行。使用跨HBV双缺口的引物检测HBV ccc DNA水平（引物及探针均由ABI公司合成）：HBV ccc DNA上游引物（1549-1566）：5′-CCCCGTCTGTGCCTTCTC-3′；下游引物（1861-1881）：5′-CAGCTTGGAGGCTTGAACAGT-3′；*Taq* Man探针（1672-1607）：5′-FAMACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTAMRA-3′。β-actin内参基因上游引物：5′-ACGGCCAGGTCATCACCAT-3′；下游引物：5′-AAGGCTGGAAGAGTGCCTCAG-3′；*Taq* Man MGB探针5′-FAMCAATGAGCGGTTCCG-MGB-3′。实时荧光定量PCR反应使用25 μl反应体系，按引物和试剂盒说明书加入试剂、引物和荧光探针，然后置于Light Cycler PCR仪器中，HBV ccc DNA及β-actin反应条件均为：50 ℃、2 min；95 ℃、2 min；95 ℃、15 s，60 ℃、1 min，40个循环。以β-actin为内参照，检测下限为2000拷贝/ml。每个标本均做3个复孔并取平均值，后计算出每毫克肝细胞内HBV ccc DNA的拷贝数。

三、统计学处理

采用SPSS 13.0软件进行统计分析，其中计量资料以$\bar{x} \pm s$表示，两组间比较采用非参数检验中的Kruskal-Wallis检验；相关性分析采用Spearman等级分析；以$\alpha = 0.05$作为检验水准，$P < 0.05$为差异具有统计学意义。

结　果

一、未行抗病毒治疗CHB患者的一般资料

未接受抗病毒治疗的A组48例CHB患者中，HBeAg阳性者33例（68.8%），HBeAg阴性者15例（31.2%）。HBeAg阳性与阴性患者之间的年龄及ALT水平差异无统计学意义（$P > 0.05$）。HBeAg阳性患者血清HBV DNA水平为（6.25 ± 1.32）$\log_{10}$IU/ml，肝细胞内HBV ccc DNA水平为（5.65 ± 1.32）$\log_{10}$拷贝/ml，均较HBeAg阴性患者显著升高（$P < 0.05$），见表1。

二、未行抗病毒治疗的CHB患者实验室指标与肝纤维化分期的相关性分析

对血清HBV DNA、ALT及肝细胞内HBV ccc DNA水平与肝组织纤维化分期进行相关性分析。结果显示，患者肝组织纤维化S分期与血清HBV DNA水平呈负相关（$r = -0.257$，$P = 0.021$），也与肝细胞内HBV ccc DNA水平呈负相关（$r = -0.465$，$P = 0.008$），与ALT水平则无相关性（$r = 0.037$，$P = 0.784$）。

三、肝细胞内HBV ccc DNA与血清HBV DNA水平的相关性分析

对两组共54例患者进行分析，结果提示肝细胞内HBV ccc DNA水平（5.46 ± 1.04 $\log_{10}$拷贝/ml）与血清HBV DNA（6.07 ± 1.25 $\log_{10}$IU/ml水平）无相关性（$r = 0.057$，$P = 0.418$）。

四、抗病毒治疗患者体内HBV标志物的表达水平

B组患者中有6例规律注射聚乙二醇化干扰素α-2a抗病毒治疗48周后，行肝组织活检并检测肝细胞内HBV ccc DNA；从A组患者中选取性别、年龄及HBV DNA水平无差异的12例患者作为对照组进行比较。结果显示，B组患者肝细胞内HBV ccc DNA及血清HBV DNA平均数值较A组均显著下降，见表2。其中3例患者HBV DNA下降至检测下限以下，但其肝细胞内仍然可检出低水平HBV ccc DNA。

讨　论

临床通常以血清HBV DNA载量作为评估患者体内病毒复制以及抗病毒疗效的重要实验室指标。目前普遍使用的抗HBV核苷类药物能抑制血清病毒至检测下限，但停药后易出现反弹，其根源在于肝细胞内HBV ccc DNA持续存在，因此清除HBV ccc DNA才是治愈乙型肝炎的关键。既往多项研究均提示，肝内HBV ccc DNA含量与血清HBV DNA无相关性，尤其在血清HBV DNA低水平时，肝组织HBV ccc DNA仍可维持一定水平甚至高水平复制[6-8]。本研究结果与以上文献报道类似，在未接受抗病毒治疗的CHB患者中，HBV ccc DNA呈稳定中等水平复制，而肝细胞HBV ccc DNA含量与血清HBV DNA水平不存在相关性，提示血清HBV DNA水平并不能完全真实反映肝组织内HBV数量及复制情况。近期研究发现，肝组织中HBV ccc DNA与血清HBsAg含量呈高度正相关，推测血清HBsAg含量可在一定程度上反映肝组织HBV实际水平[7-9]。但Yuen等[8]研究结果却显示298例发生HBsAg血清学转换的CHB患者，肝内HBV ccc DNA和HBV DNA阳性率分别为79.3%和100%。另一项研究则发现仅血清HBeAg阳性患者血清HBsAg水平才与肝组织内HBV ccc DNA呈正相关，而在HBeAg阴性患者中两者无相关性[10]。而最近国内一项研究进一步发现

表1　未抗病毒治疗组CHB患者的血清学检测（$\bar{x} \pm s$）

组别	例数	年龄（岁）	ALT（U/L）	HBV DNA（$\log_{10}$IU/ml）	HBV ccc DNA（$\log_{10}$拷贝/mg）
HBeAg阳性组	33	26 ± 9	145 ± 62	6.25 ± 1.32	5.65 ± 1.32
HBeAg阴性组	15	28 ± 11	137 ± 55	5.24 ± 1.47	4.92 ± 1.21
Z		−0.881	−0.423	−1.997	−2.153
P		0.378	0.672	0.041	0.038

表2　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	HBV DNA（$\log_{10}$ IU/ml）	HBV ccc DNA（$\log_{10}$ 拷贝/mg）
A组	12	5.47 ± 1.62	5.65 ± 1.32
B组	6	2.98 ± 0.37	3.54 ± 0.46
Z		−3.688	−3.497
P		< 0.001	< 0.001

HBsAg定量与肝内病毒复制指标间的关系在疾病不同阶段存在差异[11]。因此，血清HBsAg定量检查可否反映肝内HBV ccc DNA实际水平有待进一步深入研究证实。

肝组织病理检测是诊断肝脏纤维化“金标准”，可由于存在风险性以及难以重复操作等问题，具有一定局限性。因此，研究理想、可靠的血清学指标一直是肝纤维化研究热点之一。多个文献及本次研究结果均提示血清HBV DNA水平与肝组织纤维化程度呈负相关[3,12]，本研究进一步分析比较发现肝细胞内HBV ccc DNA与肝组织纤维化程度的相关性较血清HBV DNA强，与饶敏等[12]研究报道存在差异。由于检测肝细胞内HBV ccc DNA同样需要在肝组织活检基础上实施且过程复杂，故较难开展。但有许多研究者报道在CHB患者血清内检测到高含量HBV ccc DNA，并且通过动物实验发现血清中鸭HBV ccc DNA出现与否，与肝组织损伤严重程度（肝脏病理评分的高低）有关[13-14]。因此，肝细胞内以及血清HBV ccc DNA与肝脏组织纤维化程度之间的关系，可通过更大样本量试验进一步证实。

目前已证实，抗病毒治疗可以使肝组织HBV ccc DNA水平显著下降。国外研究发现HBeAg阳性CHB患者接受聚乙二醇化干扰素治疗后，发生HBeAg血清学转换的患者肝组织HBV ccc DNA较未发生HBeAg血清学转换的显著降低，并且其下降水平能够预测持续病毒学应答率（SVR）[15]。另外Sung等[15]则使用聚乙二醇化干扰素联合拉米夫定抗病毒治疗1年，发现肝组织HBV ccc DNA作为预测SVR的指标要显著优于血清HBV DNA载量。本研究对聚乙二醇化干扰素抗病毒治疗48周的6例患者进行研究，发现肝细胞HBV ccc DNA和血清HBV DNA水平均下降，且显著低于对照组。其中有3例患者HBV DNA水平低于检测下限，但其相应肝细胞内仍可检测到低拷贝数HBV ccc DNA，提示抗病毒治疗后尽管HBV DNA低于检测下限，但并未完全清除肝脏内HBV ccc DNA，即肝内仍存在HBV复制甚至反弹可能。这部分患者仍需要继续长期抗病毒治疗以防止病情进展，因此，仅靠HBV DNA定量不能正确地做出判断。抗病毒治疗后究竟需要多长时间才能耗竭ccc DNA，目前尚缺乏有说服力的研究成果。有学者推算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[17]。然而该结论依据并非来自可靠的数学模型，尚待进一步明确。

综上所述，外周血清HBV DNA水平并不能反映CHB患者肝脏内实际的病毒复制水平，而肝细胞内HBV ccc DNA与肝组织纤维化程度呈负相关。CHB患者的抗病毒治疗都必须长期进行，直至患者肝细胞内HBV ccc DNA全部耗竭，从而真正彻底治愈HBV感染。

参 考 文 献

1 赵克开, 缪晓辉. 乙型肝炎病毒共价闭合环状DNA检测的临床应用. 中华肝脏病杂志,2011,19(11):809-811.

2 陶晨, 叶伟. 乙型肝炎病毒感染患者血清ccc DNA检测及其临床应用. 肝脏,2012,17(2):132-133.

3 廖宝林, 林思炜, 张复春. 慢性乙型肝炎患者ALT、HBV DNA及血清肝纤维化标志物与肝纤维化程度的关系. 临床肝胆病杂志,2012,28(9):657-660.

4 中华医学会传染病与寄生虫病分会, 肝病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南2010年版更新版. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2011,5(1):50-60.

5 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. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2012,6(4):300-303.

6 李韦杰, 李伯安, 赵景民, 等. 54例慢性乙型肝炎患者肝组织乙型肝炎病毒共价闭合环状DNA与血清HBsAg定量检测结果分析. 中华肝脏病杂志,2011,19(11):815-817.

7 张琳, 吴峰, 石理兰, 等. HBV携带者血清病毒标志物和HBV DNA与肝组织中HBV ccc DNA相关性的研究. 中华实验和临床病毒学杂志,2011,25(2):112-113.

8 Yuen MF, Wong KH, Tse E, et al. HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B in the Chinese: virological, histological, and clinical aspects. Hepatology,2004,39(6):1694-1701.

9 Thompson AJ, Nguyen T, Iser D, et al. Serum hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen titers: disease phase influences correlation with viral load and intrahepatic hepatitis B virus markers. Hepatology,2010,51(6):1933-1944.

10 李莹, 韩涛, 高英堂, 等. 乙型肝炎病毒总DNA、共价闭合环状DNA和HBsAg在各种慢性乙型肝炎病毒感染者中的定量检测. 中华传染病杂志,2012,30(8):463-467.

11 应若素, 杨湛, 陈燕宇, 等. 丙氨酸氨基转移酶水平正常与轻度升高慢性HBV感染者的肝脏病理学特征比较. 中华肝脏病杂志,2012,20(8):585-588.

12 饶敏, 陆伟, 张占卿, 等. 慢性乙型肝炎患者肝组织HBV ccc DNA、总HBV DNA与血清HBV DNA的相关性及其与临床的关系. 肝脏,2012,17(6):381-384.

13 赵克开, 王青, 缪晓辉, 等. 鸭肝损伤模型血清中鸭乙肝病毒ccc DNA的动态检测. 中华医学杂志,2010,90(35):2509-2513.

14 Takkenberg B, Terpstra V, Zaaijer H, et al. Intrahepatic response markers in chronic hepatitis B patients treated with peginterferon alpha-2a and adefovir. J Gastroenterol Hepatol,2011,26(10):1527-1535.

15 Sung JJ, Wong ML, Bowden S, et al. Intrahepatic hepatitis B virus covalently closed circular DNA can be a predictor of sustained response to therapy. Gastroenterology,2005,128(7):1890-1897.

16 Wong DK, Yuen MF, Ngai VW, et al. One-year entecavir or lamivudine therapy results in reduction of hepatitis B virus intrahepatic covalently closed circular DNA levels. Antivir Ther,2006,11(7):909-916.

（收稿日期：2013-02-04）
（本文编辑：孙荣华）

刘惠媛, 廖宝林, 李凌华, 等. 慢性乙型肝炎患者肝细胞HBV ccc DNA与血清HBV DNA及肝纤维化程度的相关性[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7(3): 357-360.