

· 综述 ·

HBV ccc DNA 的检测方法及研究进展

王甜 秦波

共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, ccc DNA) 作为乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 的转录模板, 是一种独特的复制中间体, 长期聚集于宿主细胞核内, 在 HBV 生命周期及持续感染中起着关键作用。由于目前常用的抗病毒药物均不能清除 ccc DNA, 其监测对于评价抗病毒治疗疗效、判断停药时间、预测治疗后再发等方面具有着重要作用。随着分子生物学技术的发展, HBV ccc DNA 的检测方法得到不断的建立和完善, 其临床应用价值也逐渐得到探究。本文就近年来研究报道的 ccc DNA 检测方法及其临床意义等作一综述。

一、HBV ccc DNA 与 HBV 的复制

HBV 颗粒通过与肝细胞膜表面特定结构的相互作用入胞, 核衣壳释放至胞质, HBV 基因组以松弛环状 DNA (relaxed circular DNA, rcDNA) 的形式进入至宿主细胞核内。rcDNA 包含一条完整的负链 DNA (5'-末端与聚合酶 P 共价结合), 和一条不完整的正链 DNA (5'-末端含一个 RNA 寡核苷酸)。入核后 rcDNA 通过聚合酶 P 补平缺口形成 ccc DNA, ccc DNA 转录产生 pgRNA 和大小不同的 mRNA, pgRNA 作为模板, 在聚合酶 P 的作用下逆转录合成全长负链 DNA, 再通过 DNA 聚合酶作用合成正链 DNA, 产生新的 rcDNA, 随后可与病毒蛋白装配形成子代病毒颗粒继续感染健康肝细胞, 也可回到核内形成 ccc DNA 补充 ccc DNA 池^[1]。

二、HBV ccc DNA 与血清 HBV DNA 检测

HBV DNA 是 HBV 复制最直接的指标, 临床上常用实时荧光定量 PCR 法来检测血清 HBV DNA, 其正常值范围应 $< 10^3$ 拷贝/ml; 而 ccc DNA 是 HBV 复制最特异的指标, 其灵敏度及准确度均优于目前常用的 HBV DNA 检测方法。有研究发现血清 HBV DNA 低于检测下限 (< 500 拷贝/ml) 时, 肝内仍存在 ccc DNA, 且可能导致肝炎进展^[2]。因此, 血清 HBV DNA 并不能完全反映肝组织内 HBV 感染及复制情况, 需要结合患者 ccc DNA 水平来判断体内 HBV 复制的真实情况。

三、HBV ccc DNA 的检测方法

早期, 用分子生物学经典方法 Southern blot 来检测 ccc DNA 的报道较多, 但其因其操作技术要求高、不能准确定量、灵敏度不高等因素在临床上应用较少。目前应用较多的检测方法主要是基于 ccc DNA 与 rcDNA 结构上存在差异而建立的 (rcDNA 两条链上均存在缺口, 未形成超螺旋结构, 而 ccc DNA 是完整闭合的超螺旋 DNA),

通过设计跨缺口引物可实现 ccc DNA 特异性扩增, 加用绿豆核酸酶 (mung bean nuclease, MBN) 特异性降解 rcDNA 可以提高检测的特异性^[3]。最近, 用对环状 DNA 特异的滚环扩增法用于检测 ccc DNA 的报道逐渐增多。

1. PCR 技术: 包括普通 PCR、巢式或半巢式 PCR、竞争性 PCR、实时荧光定量 PCR 等。① PCR 技术的分子生物学基础为利用两种 DNA 结构上的差异, 设计跨越 rcDNA 正链及负链上两个缺口的引物, 在适当的模板起始浓度下使 ccc DNA 特异性扩增。②巢式 PCR (nested PCR) 是以上一轮 PCR 产物做为下一轮 PCR 的模板, 并设计一对与模板 DNA 的结合位点位于上一轮 PCR 产物之中的引物, 以提高检测的灵敏度。半巢式 PCR 与巢式 PCR 相似, 但在下一轮 PCR 使用的引物有一条与上一轮相同。③竞争 PCR 是在反应体系中同时引入一种已知浓度的和一种未知浓度的模板, 前者为竞争模板, 后者为目标模板, 当两种产物量相等时, 体系中目标模板和竞争模板的浓度也相等。以上的 PCR 方法在扩增结束后, 均需经凝胶电泳测定特异性产物含量。④实时荧光定量 PCR: 包括 SYBR 染料技术、Taqman 技术、Taqman-MGB 技术、分子信标技术及 FRET 探针技术等, 在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 以荧光信号的积累监测 PCR 反应进程, 实现 PCR 产物的准确定量, 是目前较多应用于 ccc DNA 检测的 PCR 技术。

Takkenberg 等^[4]用实时荧光 PCR 技术检测了 96 例慢性乙型肝炎患者的血浆样本, ccc DNA 的检测下限为 15 拷贝/10 μ l, 定量下限为 91 拷贝/10 μ l, 相关系数为 0.98, 此方法灵敏度及特异度较高, 且具有良好的可重复性。杨培等^[5]用质粒安全性 ATP 依赖性 DNA 酶 (plasmid-safe™ ATP-dependent dnase, PSAD) 酶切纯化血清提取物以提高荧光定量 PCR 的特异性, 线性范围为 $1 \times 10^2 \sim 2.77 \times 10^9$ 拷贝/ml。Gao 等^[6]发现用限制性内切酶与 PSAD 联合酶切肝组织后, 以 ccc DNA 特异引物进行实时 PCR 反应, 可降低 5 个 \log_{10} 值的非特异扩增。杨晓瑞等^[7]采用 PSAD 酶切联合 SYBR Green I 荧光染料 PCR 标准质粒的 ccc DNA, 发现在 $2.68 \times 10^8 \sim 2.68 \times 10^3$ 拷贝/ μ l 检测范围之间有良好的线性关系, Ct 值与 HBV ccc DNA 起始拷贝数的对数值的线性相关方程为 $y = -3.267X + 39.16$, 其中 y 为 Ct 值, X 为 HBV ccc DNA 起始拷贝数的对数值, 相关系数为 -1.00, 扩增效率为 102%, 最低检测限为 2.68×10^1 拷贝/ μ l, 并通过制作溶解曲线、测量升高温度后荧光的变化帮助降低非特异产物的影响, 该方法具有简便、灵敏度及特异性高、成本较低等优点。许春海等^[8]建立了 HBV ccc DNA 的巢式-实时荧光定量 PCR 检测法, 线性范围为 5.0×10^2

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.01.038

基金项目: 重庆市卫生局重点项目 (No. 2011-1-040)

作者单位: 400016 重庆市, 重庆医科大学附属第一医院感染科

通讯作者: 秦波, Email: cqqinbo@126.com

~ 3.9×10^7 拷贝/ml。

2. 入侵探针技术: 基本原理是根据目标 DNA 设计一对探针(初始探针和入侵探针)。初始探针 5'-端含一段不与目标 DNA 互补的寡核苷酸序列(“翼”), 入侵探针 3'-端的单个碱基不与目标 DNA 互补, Flap 核酸内切酶 I 将初始探针的“翼”剪切下来, 其与具有发光基团和淬灭基团的荧光能量共振转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)探针相结合, 产生荧光信号, 这个被剪切下来的“翼”作为入侵探针反复入侵, 放大的荧光信号强度与初始探针目标 DNA 量成正比。

3. 滚环扩增技术(rolling circle amplification, RCA): 是借鉴自然界中环状 DNA 分子滚环式的扩增机制而新近发展起来的一种多引物的核酸扩增技术, 通过有较高 3'-5' 核酸外切酶活性且稳定性高、出错少的噬菌体 phi29 DNA 聚合酶及寡核苷酸引物来实现模板的循环扩增, 扩增产物再由实时定量 PCR 定量, 此技术具有快速、灵敏和特异的特点。Margeridon 等^[9]首先报道运用 RCA 法扩增了 HBV ccc DNA 全长基因序列, 并能够直接检测到肝组织中最低 13 个拷贝值的 ccc DNA。国内任晓强等^[10]采用多引物滚环扩增方法, 设计了 4 对针对我国 HBV DNA 序列特点的引物进行指数化扩增, 其扩增能力大于 10^9 , 能够检测到最低 10 个拷贝的 ccc DNA, 与 Margeridon 等^[9]报道一致。随后赵旭等^[11]和 Zhong 等^[12]均成功将 PSAD 消化、滚环扩增及跨缺口实时荧光 PCR 技术联合用于检测肝组织中的 ccc DNA, 证实此方法可从极少量慢性乙型肝炎患者肝组织中检测到 HBV ccc DNA, 灵敏度低至 10^2 拷贝/ μ l, 并有良好的批内/批间重复性。这种灵敏性高的检测方法对 HBV 隐匿性感染者的诊断及正在进行抗病毒治疗患者的疗效评估有重要的意义。

四、HBV ccc DNA 检测的临床应用研究

李忠斌等^[13]应用 PSAD 消化+滚环扩增+跨缺口实时荧光 PCR 方法分析了 30 例经核苷(酸)类似物抗病毒治疗 6 个月以上的并已在血清中检测到耐药相关突变的慢性乙型肝炎患者 PBMCs 中的 HBV ccc DNA, 发现其主要为无耐药突变的野生株, 推测 PBMCs 可能是体内 HBV 野生株的“存储库”。

慢性乙型肝炎患者 e 抗原的转阴往往预示着 HBV 的复制活性减低。pgRNA 作为 HBV 复制的模板, 由 ccc DNA 转录形成。Malmström 等^[14]发现肝内 pgRNA 反映肝内 ccc DNA 含量, 且与血清 DNA 水平显著相关, e 抗原转阴后, 血清 HBV DNA 下降可能与肝内 ccc DNA 载量减少及血清 pgRNA 转录效率减低有关。

近年来, 人们认识到表观遗传学因素可通过影响 HBV 基因转录来调控其感染。Zimmerman 等^[15]设计了 6 种以 DHBV 增强子区为靶向的锌指蛋白, 证实了锌指蛋白不仅能与 DHBV 控制核心及表面启动子的增强子区结合, 还能在空间上阻碍 RNA 聚合酶通过增强子, 在转录水平上抑制病毒的复制, 干扰 ccc DNA 的补充反馈回路, 为治疗慢性乙型肝炎提供了新的思路。有研究表

明, 人类肝组织内的 ccc DNA 甲基化可抑制 HBV 的复制活力, 下调病毒蛋白的表达, Vivekanandan 等^[16]和 Kim 等^[17]在研究中也类似发现, Guo 等^[18]通过亚磷酸盐 DNA 测序显示 e 抗原阴性患者肝内 HBV ccc DNA-CpG 岛的甲基化阳性率及密度均高于 e 抗原阳性患者, 证实 ccc DNA 甲基化可减少病毒体合成。Pollicino 等^[19]和 Belloni 等^[20]通过将 HBV 微小染色体免疫共沉淀定量分析与 ccc DNA 实时 PCR 检测与相结合建立了一种新的检测方法, 发现细胞组蛋白乙酰基转移酶(CBP、p300、PCAF/GCN5)、组蛋白脱乙酰基酶(HDAC1、hSirt1)以及 HBx 调节蛋白都聚集于 ccc DNA 微小染色体周围, 低度乙酰化组蛋白及组蛋白去乙酰化酶 1 在 ccc DNA 上的聚集与血清 HBV 水平降低有关, 而 HBx 通过调节 ccc DNA 向 pgRNA 的转录促进 HBV 复制。为了进一步研究 HBx 影响 HBV 复制的机制, 其用不表达 HBx 的 HBV 突变型基因转染了 HepG2 细胞, 观察到 HBV 复制受损, ccc DNA 结合组蛋白乙酰化程度迅速降低, 组蛋白脱乙酰基酶 HDAC1 及 hSirt1 增加, 转录生成的 pgRNA 显著减少, 而补充外源性表达的 HBx 能提高 HBV 的复制能力^[20]。由此可见, HBx 以某种机制参与 ccc DNA 的表观遗传调控, 从而影响着 HBV 的复制。该研究还发现 IFN- α 通过降低与 ccc DNA 连接的组蛋白的乙酰化程度, 向 ccc DNA 募集转录辅阻碍物, 同时减少转录因子 STT1/2 与活化 ccc DNA 的结合, 从而抑制 ccc DNA 微小染色体向 pgRNA 及其他亚基因组 RNA 的转录^[21]。还有研究发现了单一 siRNA 能够显著抑制对细胞内 ccc DNA 水平, 而联合 siRNA 可以 HBV 核定位信号的不同区域为靶点, 抑制 HBsAg 和 HBeAg 表达、降低 mRNA 水平, 且在终浓度一致的情况下, 更为显著的抑制了 ccc DNA 扩增和病毒复制^[22-23]。

五、小结

持续存在于肝细胞核内的 HBV ccc DNA 难以被目前常用的抗 HBV 药物清除, 被认为是判断有无病毒复制的金标准, 监测体内 ccc DNA 水平有助于了解 HBV 慢性感染机制、评价抗 HBV 药物疗效、判断停药时机、评价 HBV 感染状态以及在肝移植术后移植肝脏是否出现再感染。如今, 已有不少灵敏度及特异性较高、重复性较好的 HBV ccc DNA 检测方法建立, 但还尚未确立一种能在临床广泛开展的方法。另外, 关于 ccc DNA 表观遗传学调控的研究结果为靶向于 ccc DNA 的抗 HBV 治疗方法带来新的希望。

参考文献

- Schädler S, Hildt E. HBV life cycle: entry and morphogenesis[J]. *Viruses*, 2009, 1(2):185-209.
- 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[J]. *肝脏*, 2012, 17(6):381-384.
- 汤勃, 王宇明, 刘俊, 等. 改良聚合酶链反应检测 HBV 共价闭合环状 DNA[J]. *世界华人消化杂志*, 2005, 13(18):2188-2192.
- Takkenberg RB, Zaaijer HL, Molenkamp R, et al. Validation of a

- sensitive and specific real-time PCR for detection and quantitation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in plasma of chronic hepatitis B patients[J]. *J Med Virol*,2009,81(6):988-995.
- 5 杨培, 秦波, 单幼兰, 等. 人工肝支持系统对重型乙型肝炎患者血清中HBV ccc DNA影响的初步研究[J]. *重庆医科大学学报*,2008,33(12):1463-1466.
- 6 Gao YT, Han T, Li Y, et al. Enhanced specificity of real-time PCR for measurement of hepatitis B virus ccc DNA using restriction endonuclease and plasmid-safe ATP-dependent DNase and selective primers[J]. *J Virol Methods*,2010,169(1):181-187.
- 7 杨晓瑞, 吴学炜, 臧利敏, 等. HBV ccc DNA SYBR Green I 荧光定量检测方法的建立及初步应用[J]. *现代预防医学杂志*,2012,39(16):4200-4204.
- 8 许春海, 李兆申, 代俊英, 等. 乙型肝炎病毒ccc DNA巢式-实时荧光定量PCR法的建立及应用[J]. *临床肝胆病杂志*,2011,27(3):283-285.
- 9 Margeridon S, Carrouée-Durantal S, Chemin I, et al. Rolling circle amplification, a powerful tool for genetic and functional studies of complete hepatitis B virus genomes from low-level infections and for directly probing covalently closed circular DNA[J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2008,52(9):3068-3073.
- 10 任晓强, 苏何玲, 邹正升, 等. 滚环扩增在乙型肝炎病毒ccc DNA检测中的应用[J]. *解放军医学杂志*,2009,34(6):675-678.
- 11 赵旭, 刘红艳, 李新艳, 等. 应用滚环扩增技术检测乙型肝炎病毒共价闭合环状DNA的研究[J]. *中华传染病杂志*,2011,28(9):513-518.
- 12 Zhong Y, Han J, Zou Z, et al. Quantitation of HBV covalently closed circular DNA in micro formalin fixed paraffin-embedded liver tissue using rolling circle amplification in combination with real-time PCR[J]. *Clin Chim Acta*,2011,412(21-22):1905-1911.
- 13 李忠斌, 任志强, 刘妍, 等. 血清病毒检出核苷(酸)类似物耐药突变的慢性乙肝患者PBMCs中HBV ccc DNA基因突变特点分析[J]. *解放军医学杂志*,2012,37(6):556-560.
- 14 Malmström S, Larsson SB, Hannoun C, et al. Hepatitis B viral DNA decline at loss of HBeAg is mainly explained by reduced ccc DNA load-down-regulated transcription of pgRNA has limited impact[J]. *PLoS one*,2012,7(7):e36349.
- 15 Zimmerman KA, Fischer KP, Joyce MA, et al. Zinc finger proteins designed to specifically target duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA inhibit viral transcription in tissue culture[J]. *J Virol*,2008,82(16):8013-8021.
- 16 Vivekanandan P, Thomas D, Torbenson M. Methylation regulates hepatitis B viral protein expression[J]. *J Infect Dis*,2009,199(9):1286-1291.
- 17 Kim JW, Lee SH, Park YS, et al. Replicative activity of hepatitis B virus is negatively associated with methylation of covalently closed circular DNA in advanced hepatitis B virus infection[J]. *Int ervirology*,2011,54(6):316-325.
- 18 Guo Y, Li Y, Mu S, et al. Evidence that methylation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in liver tissues of patients with chronic hepatitis B modulates HBV replication[J]. *J Med Virol*,2009,81(7):1177-1183.
- 19 Pollicino T, Belloni L, Raffa G, et al. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus ccc DNA-bound H3 and H4 histones[J]. *Gastroenterology*,2006,130(3):823-837.
- 20 Belloni L, Pollicino T, Nicolad FD, et al. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of ccc DNA function[J]. *PNAS*,2009,106(47):19975-19979.
- 21 Belloni L, Allweiss L, Guerrieri F, et al. IFN- α inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear ccc DNA minichromosome[J]. *J Clin Invest*,2012,122(2):529-537.
- 22 Xin XM, Li GQ, Jin YY, et al. Combination therapy of siRNAs mediates greater suppression on hepatitis B virus ccc DNA in HepG2.2.15 cell[J]. *Hepatogastroenterology*,2008,55(88):2178-2183.
- 23 Xie Q, Zhang S, Wang W, et al. Inhibition of hepatitis B virus gene expression by small interfering RNAs targeting ccc DNA and X antigen[J]. *Acta Virol*,2012,56(1):49-55.

(收稿日期: 2013-06-08)

(本文编辑: 孙荣华)

王甜, 秦波. HBV ccc DNA 的检测方法及研究进展 [J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2014, 8(1): 137-139.

中华医学学会