文章编号:1000-5404(2012)20-2127-03

技术方法

一种高特异性和灵敏性的 HBV cccDNA 检测方案研究

陈 敏[1],王永忠[1],江培学[2],张继明[3] (213001 江苏 常州,常州市第三人民医院肝病研究所[1];200444 上海,复星医学科技发展有限公司[2];200233 上海,复旦大学附属华山医院感染科[3])

[摘要] **目的** 建立一种 *Taq*Man 探针的实时 PCR 检测乙型肝炎病毒共价闭合环状 DNA(cccDNA)方案。**方法** 根据 rcDNA 与 cccDNA 结构差异,在缺口两侧设计引物,应用 *Taq*Man 探针分析,加入 1 种可以去除 rcDNA 和部分扩增产物的依赖 ATP 的内切酶(Plasmid-Safe ATP-dependent DNase)。**结果** 通过高速离心获得病毒单质颗粒验证了该方案的特异性;通过克隆和酶切得到3.2 kb 的环状 DNA 验证了方案的灵敏性。乙肝患者血清、肝组织 cccDNA 占总 HBV DNA 的比例分别为 0.03% ~0.81% 、0.4% ~28.0%。**结论** 成功地建立了以 *Taq*Man 探针检测血清和肝组织 HBV cccDNA 的实时 PCR 检测方法。

[关键词] 乙型肝炎病毒;共价闭合环状 DNA; 病毒单质颗粒;肝组织;血清
[中图法分类号] R446.9 [文献标志码] B

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)核酸检测是目前临床分析和判断患者病程和传染性的重要依据之一。共价闭合环状 DNA(covalently closed circular DNA,cccDNA)是 HBV 的原始复制模板,cccDNA 的存在是病毒复制及感染得以维持的根源,抑制或清除 cccDNA 是治疗慢性乙型肝炎(CHB)的关键。实时定量 PCR 检测肝组织 HBV、总 DNA(total DNA,tDNA)和 cccDNA 成为评价抗病毒药物疗效的金指标,也是目前肝病基础和临床研究的 1 个热点[1-3]。

当前一些研究利用实时荧光 PCR 技术检测和定量病毒中的 HBV DNA,这些研究大部分只是检测患者血液中的松弛环状 DNA(rcDNA),针对肝组织 cccDNA 研究很少[4-6]。因此,在乙肝抗病毒治疗中,急需一种高特异性,高灵敏性,方便临床应用且能够真实检测 HBV cccDNA 的方案。

1 资料与方法

1.1 研究样本

在患者知情和医院伦理委员会核准下,收集 16 例 2006 - 2010 年常州市第三人民医院传染科住院的慢性乙型肝炎患者血清和肝移植组织,诊断符合 2000 年 9 月"第十次全国病毒性肝炎及肝病学术会议"所修订的病毒性肝炎诊断标准[4]。包括 e 抗原阳性患者 11 例,其中男性患者 8 例,平均年龄 42 岁,女性患者 3 例,平均年龄 36 岁。所有样本 - 70 ℃保藏。

1.2 样本处理

所有肝组织样本和血清样本的 DNA 提取使用 Qiamp DNA Mini Kit(QIAGEN GmbH, Germany)。肝组织样本质量不少于 10 mg,提取 DNA 前电子天平称量。用 Plasmid-Safe ATP-dependent DNase 处理提取的 DNA。

从未用抗病毒药物的慢性乙肝患者的血清中分离 HBV DNA,然后构建 HBV 全基因质粒 pUC-536207(GenBank 登录号 AY220698,B 基因型)。以此作为阳性对照。

通过滤膜和超高速离心制备 HBV 病毒单质颗粒作为阴性对照。

1.3 Plasmid DNA 校正品的制备

考虑扩增效率等因素,用于定量的校正品片段大小应该和 cccDNA 一致。取 HBV 全基因 pUC-536207 质粒,通过酶切然后连接制备成 3.2 kb 环状 DNA 片段用以作为 cccDNA 定量校正品。

1.4 内参

GAPDH 基因作为人体内单拷贝数管家基因,和样本同时检测来估测每个 PCR 反应中的肝细胞数目。

1.5 检测方法

扩增 cccDNA 的 PCR 引物序列是:HBV-1549, 5′-TCCCCGTCT-GTGCCTTC-3′;HBV-1904, 5′-CCCCAAAGCCACCCAA-3′,在序列中的位置相应为 1 549 ~ 1 565 和 1 904 ~ 1 889。荧光探针的位置是: 5′-FAM-ATCTGCCGGACCGTGTGC-TAMARA-3′ (1 567 ~ 1 582)。具体位置见示意图 1。PCR 反应条件:①预变性94 ℃ 4 min,②变性 94 ℃ 15 s,退火与延伸 60 ℃,45 s,共 40 个循环。血清 HBV DNA 和肝组织 tDNA 定量使用乙肝病毒定量检测试剂盒(上海复星医学科技发展有限公司)。肝组织细胞数目通过内参 GAPDH 基因进行估测,中值确定为 1×10^6/mg。

2 结果

2.1 PCR 灵敏性分析

为了保证 PCR 反应的灵敏性,引物设计时参考了 HBV

[通信作者] 张继明,电话:(021)52889999,E-mail: jmzhang@fudan.edu.cn

A～F 8 个基因型的序列。酶切后与 cccDNA 等长度的质粒片段通过罗氏试剂定量后，从 1.5×10^8 到 1.5×10^2，依次 10 倍稀释，扩增见图 2。

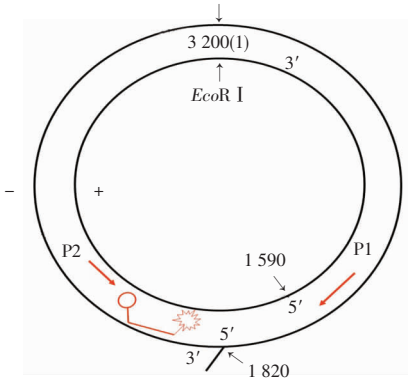


图 1　HBV cccDNA 引物探针位置示意图

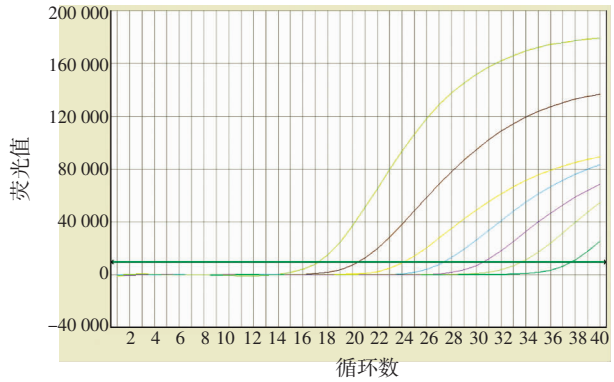


图 2　1.5×10^2～1.5×10^8 的同乙肝病毒等长度质粒片段的扩增曲线分析

2.2　PCR 特异性分析

cccDNA 引物的特异性通过扩增纯病毒单质颗粒和 Plasmid-Safe ATP-dependent DNase 处理来验证。通过高速离心分离得到的病毒单质颗粒可以确认不会含有 cccDNA 。我们从文献[7]上找到基于 *Taq*Man 技术检测 HBV cccDNA 的方案作为比较。依据文献[7]合成引物探针，并用文献[7]提供的条件扩增病毒单质颗粒 DNA；提取的 HBV 病毒单质颗粒 DNA，依次稀释，从 1.5×10^6 到 1.5×10^4，同时跟本方案作比较。本方案 3 个梯度的单质颗粒 DNA 都没有扩增，而 He 等[7]的方案 3 个梯度均有明显的扩增曲线。见图 3。由此可见，本方案有较好的特异性。

通过 Plasmid-Safe ATP-dependent DNase 对肝组织和血清样本的消化处理确保 DNA 引物的特异性。酶处理前后肝组织和血清样本的 cccDNA 拷贝数均出现变化，尤其是血清样本，DNA 拷贝数最多降低 4 个数量级（表 1）。

2.3　cccDNA 和 tDNA 的检测结果

我们对 16 例慢性乙肝患者的 HBV DNA 进行了检测，肝组织和血清的总 HBV DNA 以及 cccDNA 检测结果见表 2。血清总 HBV DNA 的水平分布在 5.42×10^4～6.21×10^8 拷贝/ml；16 例血清中有 9 例检测到了 cccDNA，浓度从 9.73×10^2～2.69×10^4 拷贝/ml。样本总 HBV DNA 每 10^6 个细胞的浓度水平从 1.03×10^6～9.54×10^8；而检测样本 cccDNA 每 10^6 个细胞的 HBV 浓度水平从 4.49×10^4～9.53×10^7。血清总 HBV DNA 水平也高于血清 HBV cccDNA 水平，血清 cccDNA 占总 HBV DNA 的比例在 0.03%～0.81%。同时，肝组织的 HBV cccDNA 浓度水平相比更高，它与总 HBV DNA 比例在 0.4%～28.0%。

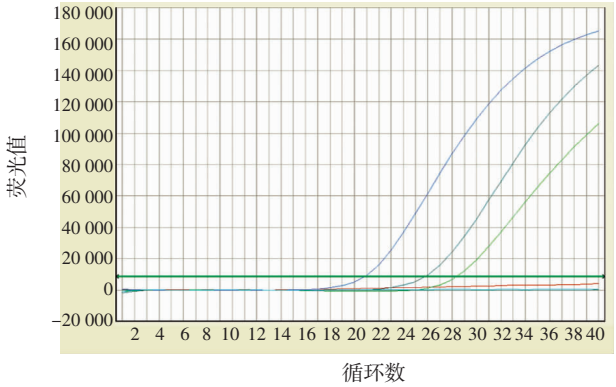


图 3　不同 *Taq*Man PCR 方案扩增 HBV ccc DNA 的曲线分析

表 1　Plasmid-Safe ATP-dependent DNase 处理肝组织和血清样本的病毒量比较

样本编号	HBeAg 特征	肝组织 HBV DNA（拷贝数/10^6）		血清 HBV DNA（拷贝数/ml）	
		DNase 处理	无 DNase 处理	DNase 处理	无 DNase 处理
7	+	1.02×10^8	3.35×10^8	5.69×10^4	9.32×10^7
15	+	7.65×10^6	4.21×10^8	8.23×10^4	2.24×10^8
19	−	7.80×10^5	1.13×10^7	1.12×10^2	6.97×10^6
26	−	6.21×10^5	1.03×10^6	1.02×10^2	5.42×10^4

3　讨论

本研究对 16 例患者的外周血进行检测，其中 9 例检测到 cccDNA 的存在，且外周血 HBV DNA 1.0×10^7 以下的患者不能检测到 cccDNA。Kock 等[8]用乙肝病毒去感染体外培养的外周血单个核细胞（PBMCs）时，发现不能在细胞内检测到 cccDNA，相反，如果转染的是肝细胞，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 PBMCs 中，则只能检测到 rcDNA。这个观点同我们的研究一致。我们认为乙肝病毒不能感染 PBMCs，即使 PBMCs 中检测到乙肝病毒，也只是血液的病毒 DNA，其与 PBMCs 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 PBMCs 所“吸收”（absorption），并没有建立真正意义上的感染状态[9-10]。

表2 乙肝病毒DNA的检测结果

样本编号	HBeAg特征	血清HBV DNA(拷贝数/ml)			肝组织HBV DNA(拷贝数/10^6)		
		总DNA	cccDNA	cccDNA比例(%)	总DNA	cccDNA	cccDNA比例(%)
3	+	1.36×10^7	9.42×10^3	0.6	4.87×10^7	1.50×10^6	3.0
6	−	6.89×10^6			3.51×10^7	3.24×10^6	9.2
7	+	9.32×10^7	3.63×10^4	0.30	3.35×10^8	9.53×10^7	28.0
9	+	2.65×10^7	6.02×10^3	0.20	8.74×10^7	6.32×10^6	7.2
12	+	6.21×10^8	2.35×10^4	0.03	9.54×10^8	2.44×10^7	2.5
15	+	2.24×10^8	2.05×10^4	0.09	4.21×10^8	1.05×10^6	2.4
18	−	1.89×10^6			7.53×10^6	2.87×10^5	3.8
19	+	6.97×10^6			1.13×10^7	2.22×10^5	1.9
20	−	6.32×10^6			9.07×10^6	4.49×10^4	0.4
21	+	1.02×10^7	8.23×10^3	0.81	3.08×10^7	3.99×10^6	12.9
22	+	8.54×10^6	9.73×10^2	0.11	1.91×10^7	8.97×10^5	4.6
24	−	1.13×10^6			4.79×10^6	1.27×10^6	27.0
26	−	5.42×10^4			1.03×10^6	2.54×10^5	24.0
29	+	2.31×10^7	1.23×10^3	0.05	3.80×10^7	1.24×10^6	3.2
32	+	1.25×10^8	2.69×10^4		3.64×10^8	2.08×10^7	5.7
35	+	8.69×10^6	1.74×10^3	0.20	2.22×10^7	1.43×10^6	6.4

本研究表明,HBeAg(+)慢性乙肝患者的cccDNA水平要高于HBeAg阴性慢性乙肝患者和HBV携带者。在所有HBeAg(−)患者肝组织中也能检测到cccDNA,这解释了为何HBeAg阴性患者病情仍有可能出现进展和恶化。事实上,HBV的复制和肝炎进展在整个自然史中是反复波动的。即使HBsAg清除的患者,在肝组织内仍可以检测到少量的cccDNA。

cccDNA是乙肝病毒持续感染的关键因素,也是HBV复制的特异性指标,其准确性超过目前常用的HBV DNA检测。对于慢性HBV感染者肝组织内cccDNA的定量检测可以作为监测抗病毒反应和决定治疗终点的一个关键指标[11-13]。cccDNA检测技术的完善和对cccDNA分子机制的进一步认识,有助于人们发掘出针对HBV复制各个环节的抗病毒新药,达到减少耐药发生、减少复发和激活宿主免疫反应的目的。

参考文献:

[1] 韩思源, 王燕. 乙型肝炎患者血清中HBV cccDNA、HBV DNA、HbsAg与HbeAg定量关系的分析[J]. 吉林医学, 2011, 32(24): 5067-5068.

[2] 张占卿, 陆伟, 张小楠, 等. 肝组织HBV总DNA和cccDNA阴性参考值的探讨[J]. 同济大学学报: 医学版, 2011, 32(5): 27-35.

[3] 任伟宏, 赵素玲, 李延卿, 等. 乙型肝炎患者血清中HBV cccDNA与HBV DNA、HBsAg和HBeAg定量关系的分析[J]. 检验医学, 2010, 25(6): 438-441.

[4] Newbold J E, Xin H, Tencza M, *et al*. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes[J]. J Virol, 1995, 69(6): 3350-3357.

[5] Wu T T, Coates L, Aldrich C E, *et al*. In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway[J]. Virology, 1990, 175(1): 255-261.

[6] Shao J B, Chen Z, Ni W Q, *et al*. A quantitative method to detect HBV cccDNA by chimeric primer and real-time polymerase chain reaction[J]. J Virol Methods, 2003, 112(1/2): 45-52.

[7] He M L, Wu J, Chen Y, *et al*. A new and sensitive method for the quantification of HBV cccDNA by real-time PCR[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 295(5): 1102-1107.

[8] Kock J, Borst E M, Schlicht H J. Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocyes occurs by endocytosis but dose not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment[J]. J Virol, 1996, 70(9): 5827-5831.

[9] Mason W S, Cullen J, Moraleda G, *et al*. Lamivudine therapy of WHV-infected woodchucks[J]. Virology, 1998, 245(1): 18-32.

[10] 赵克开, 缪晓辉. 乙型肝炎病毒cccDNA检测的方法与临床意义[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(4): 315-317.

[11] Chen C J, Yang H I, Su J, *et al*. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level[J]. JAMA, 2006, 295(1): 65-73.

[12] Matthews S J. Entecavir for the treatment of chronic hepatitis B virus infection[J]. Clin Ther, 2006, 28(2): 184-203.

[13] Lok A S, McMahon B J. Chronic hepatitis B[J]. Hepatology, 2007, 45(2): 507-539.

(**收稿**:2012-04-25;**修回**:2012-06-25)

(编辑 王 红)