论 著 文章编号:0253-3626(2008)12-1463-04

# 人工肝支持系统对重型乙型肝炎患者血清中 HBV cccDNA 影响的初步研究

杨 培[1],秦 波[2],单幼兰[2],刘 杞[3]

(1. 重庆市血液中心成份科,重庆 400015; 2. 重庆医科大学附属第二医院感染病科,重庆 400010;
3. 重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:建立 HBV cccDNA 荧光定量 PCR 方法并检测重型乙型肝炎患者人工肝血浆置换治疗前后血清中 HBV cccDNA 含量。初步探索人工肝支持系统对重型乙型肝炎患者血清中 HBV cccDNA 的影响。方法:以 50 例重型乙型肝炎患者人工肝血浆置换治疗前后血清作为检测标本,对血清中总 HBV DNA、HBV cccDNA 含量进行定量检测。用 SAS8.0 统计软件对结果进行统计学分析。结果:成功建立定量检测 HBV cccDNA 方法并证实在重型乙型肝炎患者血清中存在 HBV cccDNA。在人工肝血浆置换前后总 HBV DNA 及 HBV cccDNA 含量明显降低($P<0.05$)。总 HBV DNA 与 HBV cccDNA 之间有较好的相关性($r=0.78$,$P<0.01$)。总 HBV DNA 水平与 PT($r=0.37$,$P<0.01$)、ALT($r=0.29$,$P<0.05$)、AST($r=0.39$,$P<0.01$)水平有一定的相关性;HBV cccDNA 水平与 PT($r=0.34$,$P<0.05$)、ALT($r=0.34$,$P<0.05$)、AST($r=0.40$,$P<0.01$)水平有一定的相关性。结论:总 HBV DNA 及 HBV cccDNA 在一定程度上能够反映肝细胞坏死程度;血浆置换术后病毒含量明显降低,为进一步研究重型乙型肝炎治疗途径及发病机制打下基础。

【关键词】肝炎病毒,乙型;共价闭合环状 DNA;荧光定量 PCR;重型乙型肝炎;人工肝支持系统
【中国图书分类法分类号】R512.62 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-17

作者介绍:杨 培(1981- ),女,硕士,
研究方向:重型肝炎发病机制及治疗。
通讯作者:秦 波,男,教授,E-mail: cqqinbo@126.com。
基金项目:重庆市卫生局重点科研课题资助项目,(渝卫科教(2005)31 号)。

## 参 考 文 献

[1] Seo D W,Hong S B. Epileptogenic focion subdural recording in intractable epilepsy patients with temporal dysembryoplastic neuroepithelial tumor[J]. Korean Med Sci,2003,8:559-565.

[2] David I S,John R,Catalina D,et al. Surgical outcomes and seizure control rates after resection of dysembryoplastic neuroepithelial tumors[J]. Neurosurg,2005,6:15-18.

[3] Rothoerl R D,Bernreuther D,Woertgen C,et al. The value of routine electroencephalographic recordings in predicting postoperative seizures associated with menlngioma surgery[J]. Neurosurg Rev,2003,26:108-112.

[4] O' Connor S C,Robinson P A. Analysis of the electroencephalographic activity associated with thalamic tumors[J]. J. Theoretical Biology,2005,233:271-286.

[5] Zenter J,Hufnagel A,Wolf H K,et al. Surgical treatment of neoplasm's associated with medically intractable epilepsy[J]. Neurosurgery,1997,41(2):378-386.

[6] Boonyapisit K,Najm I,Klem G ,et al. Epileptogenicity of focal malformation due to abnormanl cortical development:direct electrocorticographic-histopathologic correlations[J]. Epilepsia,2003,44 69-76.

[7] Penfield W,Erickson T C,Trlov L. Relation of Intracranial *tumors and symptomatic epilepsy*[J]. *Arch Neurol Psychiatry*(so 096-6754),1940,44:300-315.

[8] Henrich—Noack P,Prehn J H,Krieglstein N J. Tgf-beta 1 protects hippocampal neurons against degeneration caused by transient global ischemia dose-response relation-ship and potential neuroprotective mechanisms[J]. Stroke(S0039-2499),1996,27(9):1609- 1614.

[9] Fernandez Torre J L,Alarcon G,Binnie C D,et al. Genera lion of scalp discharges in temporal lobe epilepsy as suggested by intraoperative electrocortlcographic recordings[J]. J Neurol Neurosurg Psychiat,1999,67:51-58.

[10] Patt S,Steenbeek J,Hochstetter A,et al. Sourcd localization and possible causes of interictal epileptic activety in tumor associated epilepsy[J]. Neurobiology of Disease,2000,(2):260-269.

(责任编辑:冉明会)

# Preliminary study effect of artificial liver support on HBV cccDNA in patients with fulminant hepatitis B

*YANG Pei,et al*

(*Department of Blood Constitaent, Chongqing Blood Center*)

【Abstract】 *Objective*: To establish a new fluorescence-based quantitative PCR assay for detecting hepatitis B virus covalently closed circular DNA(HBV cccDNA). To explore the effect of artificial liver support system(ALSS) on total HBV DNA and HBV cccDNA in sera of patients with fulminant hepatitis B. *Methods*: The serum specimens from 50 patients of fulminant hepatitis B prior to and after treatment with ALSS were collected. Then HBV cccDNA was quantitatively detected by fluorescent PCR with specific primer set and Taqman probe.And the results were analyzed by SAS8.0 statistics software. *Results*: We successfully established a new fluorescence-based quantitative PCR method for HBV cccDNA.HBV cccDNA was detectable in sera of the patients with fulminant hepatitis B. The level of total HBV DNA and HBV cccDNA decreased significantly following plasma exchange in ALSS. The levels of total HBV DNA and HBV cccDNA had positive correlation with degree of PT, ALT, andAST. Total HBV DNA also had positive correlation with HBV cccDNA. *Conclusion*: The level of total HBV DNA and HBV cccDNA has positive correlation with degree of PT, ALT, and AST, which might be indication of hepatocyte damage.The finding that significant decrease in total HBV DNA and HBV cccDNA after plasma exchange in ALSS may provide a clue of further research about the fulminant hepatitis B treated with ALSS.

【Key words】 Hepatitis B virus; cccDNA; Fluorescence-based; Quantitative PCR; Fulminant hepatitis B; Artificial liver support system

乙型肝炎病毒基因组由 3 200 bp 组成，是一种部分环状双链 DNA 分子，称之为松弛环状 DNA (Relaxed circular DNA, rcDNA)。在 HBV 的复制过程中，病毒侵入宿主肝细胞后，脱去外壳蛋白，rcDNA 进入肝细胞核中，在宿主 DNA 聚合酶的作用下，两条链上的缺口均被补齐，并进一步折叠、扭曲，形成超螺旋结构的共价闭合环状 DNA (Covalently closed circular DNA, cccDNA)分子[1]。HBV cccDNA 分子的形成是病毒复制的起始步骤，是病毒随后在肝细胞内一系列复制过程的原始模板，是在宿主肝细胞内建立感染状态最重要的标志。因此，在乙型肝炎治疗过程中开展 HBV cccDNA 的定量动态检测，无疑具有十分重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及研究对象

重组质粒 pCDNA3.1-HBV1.3 由美国芝加哥大学分子肿瘤中心何通川博士惠赠，带有 HBV 完整基因组，大小为 9.4 kb。主菌 JM109 由重庆医科大学病毒性肝炎研究所提供。收集 2005 年 10 月至 2006 年 8 月间 50 例接受血浆置换治疗的慢性乙型重型肝炎患者，诊断符合 2000 年 10 月西安中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订的病毒性肝炎防治方案[2]。其中男性 41 例，女性 9 例，年龄 25~73 岁，平均 42.5 岁。收集血浆置换治疗前后患者全血 5 ml，2 000 r/min离心取上清，-70℃保存。

### 1.2 方法

1.2.1 建立总 HBV DNA 及 HBV cccDNA 检测方法 以重组质粒 pCDNA3.1-HBV1.3 为标准品通过优化探针设计及反应条件、反应体系建立了稳定的检测 HBV cccDNA 的荧光定量 PCR 方法。荧光探针序列：HBVcccDNA 探针 FAM5'-CAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCA-3'TAMRA；总 HBV DNA 探针：FAM5'-CGCTTACAGACCACCAAATGCC-CCTATCT-3'TAMRA。引物序列：HBVcccDNA 引物：HBV_1660 (上游引物)5'-GGACTCTTGGACTCTCAGCAATG-3',HBV_1712 (下游引物)5'-CCTCCCAGTCTTTAAACAAACAGTCT-3';总 HBV DNA引物：HBV_2259 (上游引物)5'-TGTCTTTTGGAGTGTG-GATTCG-3',HBV_2335 (下游引物)5'-GCCTCGTCGTCTAA-CAACAGTAGTT-3'。反应条件：95℃ 预变性 5 min，95℃ × 25 s、54℃ × 30 s、72℃ × 25 s 共 40 个循环。反应体系：Taq DNA 聚合酶(2.5 U/μl)1 μl、10 × PCR 反应 Buffer(含 $MgCl_2$)5 μl、dNTPs(10 mmol/L each)1 μl、primer1(10 μmol/L)1 μl、primer2 (10 μmol/L)1 μl、探针 (10 μmol/L)1 μl、DNA 模板 3 μl、dd$H_2O$ 12 μl。数据在退火期的"single"模式获得，选择 F1/F2 通道，以"fit point"描点法分析荧光曲线。

1.2.2 PE 治疗方法 应用日本可乐丽医疗器材株式会社(Kuraray)生产的 KM-8800 型血浆置换装置进行血浆置换治疗。患者取平卧位，取右侧桡动脉、左侧肘正中静脉穿刺与人工肝血浆置换仪器管路连接，建立循环通路。非那根 12.5 mg 肌注、10%葡萄糖酸钙 1 g 静脉推注后，开始置换治疗。术中交换血浆量 2 600 ml，分离血浆速度 20~40 ml/min，血浆置换流量 40~100 ml/min。血浆交换完毕后，鱼精蛋白 20 mg 静脉

推注中和肝素，拔出穿刺针，局部加压包扎固定。术中及术后 2 h 心电监护患者心率、血压等生命体征。

1.2.3 检测患者血清中 总 HBV DNA 及 HBV cccDNA 用美国 QIAGEN 公司 QIAamp®DNA Mini Kit 提取患者血清中 DNA。在检测 HBV cccDNA 前用德国 EPICENTRE 公司生产的 Plasmid_Safe™ ATP_dependent Dnase 对抽提的 DNA 进行酶切消化。PCR 反应条件及反应体系同上。

1.2.4 统计学方法

用 SAS8.0 软件对有关数据进行统计学分析，包括 $t$ 检验，秩和检验，Spearman 秩相关等分析方法。

## 2 结 果

成功建立定量检测 HBV cccDNA 的 PCR 反应体系，所建立的总 HBV DNA 及 HBV cccDNA 标准曲线都有极好的相关性，相关系数分别为 -0.99 及 -1.00 其线性范围为 $1\times10^2$~$2.77\times10^9$ 拷贝 /ml（见图 1、2），通过批间及批内重复实验可以看到该检测体系有良好的重复性（见图 3、4）。

总 HBV DNA、HBV cccDNA 含量在 PE 术后明显降低（见表 1）。PE 术后肝脏功能及凝血功能明显改善（见表 2、3），总 HBV DNA 与 HBV cccDNA 具有较好相关性（见表 4）。术前总 HBV DNA、HBV cccDNA 含量与 PT、ALT、AST 水平均有相关性，与 TB 无相关性（见表 4、5）。

## 3 讨 论

重型肝炎病情发展快、并发症多，病死率极高。人工肝支持系统是一种能部分代替正常肝脏功能的体外装置，其目的是维持重型肝炎患者生命，使之能够等待肝移植或促使患者自身肝功能恢复。血浆置换（Plasma exchange，PE）是一种中间型人工肝，是将肝衰竭患者含有毒素或致病物质的血浆分离出来、弃去异常血浆，输入正常血浆或人血白蛋白等，以清除循环中蛋白结合毒素、异常抗体等，同时补充患者缺乏的凝血因子、白蛋白等多种物质。与多数文献报道相似[3,4]，PE 术后患者血清中 TB、ALT、AST、白蛋白含量及凝血功能等都有明显改善。低蛋白血症易导致肝性腹水的产生，通过血浆置换治疗增加患者血浆中白蛋白含量，不仅有利于预防腹水的产生，也可以促进腹水的消退；通过降低胆红素等细胞毒性物质的含量，有利于肝细胞的再生与修复。凝血酶原时间明显缩短，可能是与补充含大量凝血因子的新鲜血浆有关。凝血象的改善能降低患者出血的发生率，使患者因大出血导致的死亡率降低。在临床工作中 PT、ALT、AST 通常作为反映肝细

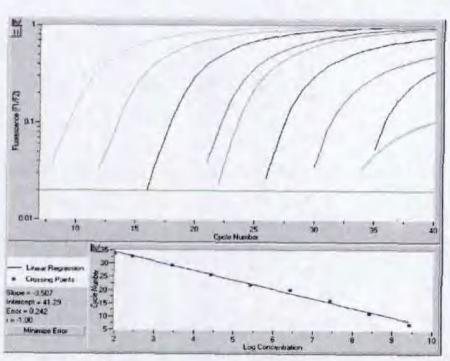


图 1 HBV cccDNA 标准曲线

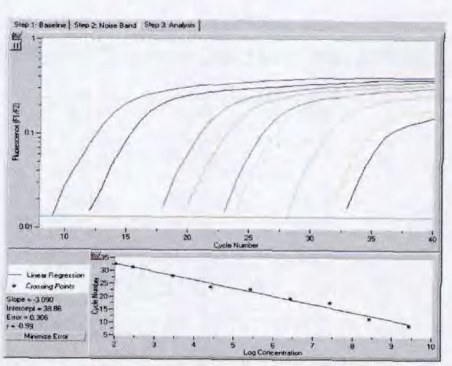


图 2 总 HBV DNA 标准曲线

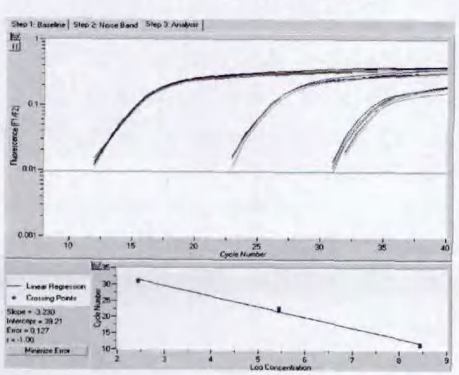


图 3 HBV cccDNA 批内重复

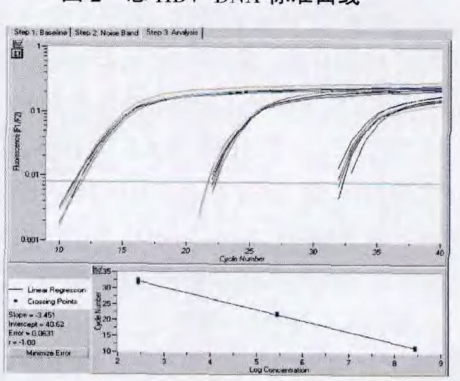


图 4 总 HBV DNA 批内重复

表 1 血浆置换前后病毒含量变化

| | 治疗前 | 治疗后 | *P* 值 |
|---|---|---|---|
| 总 HBV DNA(log10 拷贝 /ml) | 6.12 | 5.93 | <0.05 |
| HBV cccDNA(log10 拷贝 /ml) | 5.14 | 5.04 | <0.05 |

表 2 血浆置换前后肝功能变化($\bar{x} \pm s$)

| | 治疗前 | 治疗后 | *P* 值 |
|---|---|---|---|
| ALT(U/L) | 236.20 ± 297.20 | 127.12 ± 165.31 | <0.000 1 |
| AST(U/L) | 210.52 ± 191.51 | 117.44 ± 106.00 | <0.000 1 |
| TB(μmol/L) | 477.34 ± 168.21 | 307.35 ± 126.20 | <0.000 1 |
| DB(μmol/L) | 292.23 ± 102.53 | 182.29 ± 75.46 | <0.000 1 |
| Alb(g/L) | 29.87 ± 4.01 | 31.85 ± 2.67 | <0.000 1 |

表 3 血浆置换前后凝血功能变化($\bar{x} \pm s$)

| | 治疗前 | 治疗后 | *P* 值 |
|---|---|---|---|
| PT(s) | 25.65 ± 12.66* | 18.94 ± 2.92 | <0.000 1 |
| PTA(%) | 39.50 ± 17.25 | 55.90 ± 17.47 | <0.000 1 |

表 4 血清 HBV cccDNA 与总 HBV DNA、TB、PT、ALT、AST 相关性

| | 总 HBV DNA | TB | PT | ALT | AST |
|---|---|---|---|---|---|
| 相关系数(*r*) | 0.78 | 0.06 | 0.34 | 0.34 | 0.40 |
| *P* 值 | <0.01 | >0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.01 |

表 5 血清总 HBV DNA 与 TB、PT、ALT、AST 相关性

| | TB | PT | ALT | AST |
|---|---|---|---|---|
| 相关系数(*r*) | 0.18 | 0.37 | 0.29 | 0.39 |
| *P* 值 | >0.05 | <0.01 | <0.05 | <0.01 |

胞损伤程度的指标。本研究发现总 HBV DNA 及 HBV cccDNA 都与 PT、ALT、AST 存在相关性，说明总 HBV DNA、HBV cccDNA 均能在一定程度上反映肝脏损伤程度。HBV cccDNA 是在肝细胞内存在的，随着肝细胞坏死，HBV cccDNA 也随之释放到外周血中，血清中 HBV cccDNA 的出现可能是肝脏损伤的早期信号[5]。总 HBV DNA 与 HBV cccDNA 之间存在较好的相关性，在总 HBV DNA 阴性的标本中同样不能检测到 HBV cccDNA，说明总 HBV DNA、HBV cccDNA 在反映肝细胞损伤程度及病毒复制状况方面有较好的一致性。

有研究表明[6]在拉米夫定治疗 48 周后虽然肝组织及血清中 HBV DNA 明显降低，但肝组织中 HBV cccDNA 仍维持一定水平，与治疗前相比无明显降低。HBV cccDNA 作为乙肝病毒基因组的复制中间体、mRNA 和前基因组 RNA 的模板，是乙肝病毒持续感染的关键因素[7]。加强体内 HBV cccDNA 的检测，研究其维持和清除机制，是当前乙型肝炎抗治疗迫切需要解决的问题。本研究发现人工肝支持系统能一定程度上降低患者血清中乙肝病毒包括 HBV ccc DNA 的含量，从而减轻由于病毒引起的原发性及继发性损害，为进一步探索人工肝支持系统通过干预乙型肝炎病毒复制模板而影响重型乙型肝炎结局的可能性打下了基础。

## 参 考 文 献

[1] Seeger C, Mason W S. Hpatitis B virus biology[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64(1): 51-68.

[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[J]. 中华传染病杂志, 2001, 19(1): 56-62.

[3] Lanjuan L, Qian Y, Jiangrong H, et al. Severe hepatitis treated with an artificial liver support system[J]. Int J Artif Organs, 2001, 24(5): 297-303.

[4] 秦 波, 郄春花, 张大志, 等. 人工肝支持系统治疗慢性重型肝炎临床研究[J]. 中国血液净化, 2004, 3(4): 211-213.

[5] Chen Y, Sze J, He M L. HBV cccDNA in patients' sera as an indicator for HBV reactivation and an early signal of liver damage[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(1): 82-85.

[6] 闫 勇, 任万华, 包成梅. 肝组织 HBV cccDNA 定量检测在慢性乙型肝炎诊断及治疗中的作用[J]. 山东医药, 2007, 47(26): 12-13.

[7] 陈 智. 乙型肝炎病毒 cccDNA 研究现状[J]. 中华传染病学杂志, 2003, 21(1): 8-10.

（责任编辑：关蕴良）