肿瘤诊断与治疗 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.000747

肝癌患者肝组织中乙肝病毒共价闭合环状 DNA 表达水平及与 e 抗原相关性研究

黄 瑶，罗 璇，陈彦猛，黄爱龙，胡 源
重庆医科大学教育部感染性疾病分子生物学重点实验室，重庆 400016）

【摘 要】目的：定量分析乙肝病毒（hepatitis B virus，HBV）感染的肝癌患者肝内共价闭合环状 DNA（covalently closed circular DNA，cccDNA）、DNA 和血清中 DNA 的表达水平，并分析其与乙肝病毒 e 抗原（hepatitis B e antigen，HBeAg）状态的相互关系。方法：运用特异性荧光定量探针法检测了 26 例 HBV 感染的肝癌患者中 HBV cccDNA 和 HBV DNA 的表达水平，进一步分析这两种病毒因子在 HBeAg 阳性和 HBeAg 阴性样本中的表达差别以及与 HBeAg 状态的关系。结果：HBV cccDNA 和 HBV DNA 在 HBeAg 阴性组的表达水平均显著低于 HBeAg 阳性组（P 值分别为 0.044 和 0.0214），同时，在 HBeAg 阴性组中，cccDNA 的表达水平与 DNA 是显著正相关的（r=0.918，P=0.000）；HBeAg 阳性组中 cccDNA 与 DNA 是较弱的正相关关系，且不具有显著性（r=0.591，P=0.072）。结论：肝内 cccDNA 与 DNA 表达水平与 HBeAg 的状态是密切相关的，HBeAg 阴性的 HCC 患者中病毒复制水平下降的原因主要是 cccDNA 水平的下降。

【关键词】乙型肝炎病毒；肝癌；共价闭合环状 DNA；乙肝病毒 e 抗原
【中图分类号】R512.6+2；R331 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-05-27

Quantification of intrahepatic cccDNA, DNA, serum HBV DNA and its relationship with HBeAg in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma

Huang Yao, Luo Xuan, Chen Yanmeng, Huang Ailong, Hu Yuan
(Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Disease, Ministry of Education, Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective*** To quantify intrahepatic cccDNA, DNA, serum HBV DNA and to analyze its relationship with HBeAg in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. ***Methods*** The intrahepatic HBV cccDNA and DNA levels in 26 HBV-related HCC patients were measured by real-time PCR, and the differences were compared between HBeAg-positive and HBeAg-negative patient samples. Finally, their relationship with HBeAg status was also analyzed. ***Results***: Intrahepatic HBV cccDNA and DNA levels in HBeAg-negative patients were significantly lower than those in HBeAg-positive patients (P=0.044, P=0.0214). Meanwhile, intrahepatic HBV cccDNA was significantly positively correlated with DNA in HBeAg-negative patients (r=0.918, P=0.000). In HBeAg-positive patients, the positive correlation between cccDNA and DNA was weak and insignificant (r=0.591, P=0.072). ***Conclusion*** Expression levels of intrahepatic cccDNA and DNA is closely related with HBeAg status, and low viremia in HBeAg-negative HCC patients is mainly due to lower cccDNA levels.

【Key words】hepatitis B virus; hepatocellular carcinoma; covalently closed circular DNA; hepatitis B e antigen

慢性乙肝病毒（hepatitis B virus，HBV）感染至今仍是危害健康的重要问题，全球每年约有 3.5 亿人感染 HBV[1]。HBV 的持续感染是引起肝癌（hepatocellular carcinoma，HCC）发生的高风险因素[2]，据估计超过 80% 的肝癌发生与慢性 HBV 的感染密切相关[3]，并且近年来有大幅度上升的趋势。HBV 共价闭合环状 DNA（covalently closed circular DNA，cccDNA）不仅是 HBV DNA 转录的模板，也是 HBV 持续感染的关键因素。在慢性乙肝患者的各个阶段，都能检测到 HBV cccDNA[4]。因此检测 HBVcccDNA 和病毒复制水平的参数_HBV DNA 的表达水平，可更为精准的反映感染肝细胞中病毒的状态。

乙型肝炎 e 抗原（hepatitis B e antigen，HBeAg）

作者介绍：黄 瑶，Email：475722448@qq.com，
研究方向：细胞生物学。
通信作者：胡 源，Email：tottyhy@163.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目(编号：81471945)，重庆市科委自然科学基金资助项目 编号：cstc2014jcyjA10075)。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150818.2109.004.html 2015-j08-18)

是由 3.5 kb 的 HBV pre C mRNA 编码形成，反映病毒的高水平复制。早前有报道认为在慢性感染中 cccDNA 与 HBeAg 状态密切相关，作为慢性乙肝感染的最后阶段，HCC 中 cccDNA 和 HBeAg 是否仍然存在相关性尚无报道，因此本文主要研究了 26 例 HBV 感染引起的 HCC 临床患者中肝组织内 cccDNA、DNA 和血清中的 DNA 的表达水平，并分析其与 HBeAg 阴性和阳性状态的相互关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 研究对象 从重庆医科大学附属第一和第二医院感染科获得 26 例 HBV 感染引起的 HCC 患者接受手术切除后的肝癌组织样本，按照临床样本库的标准进行各项检测指标采集，保存于 -80 ℃冰箱备用，标本排除了丙肝病毒和艾滋病毒的共感染。

1.1.2 实验试剂 测定患者的血清学指标（HBsAg、HBeAg 等）的 ELISA 试剂盒采用上海科华公司；肝组织 DNA 的提取试剂盒采用德国 Qiangen 公司的 QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒，荧光定量 PCR 试剂采用 Promega 公司，PSAD 酶（Plasmid-safe ATP-depended DNAase）购于美国 Epicentre 公司，引物和探针由上海英俊公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 肝组织中 HBV cccDNA 和 HBV DNA 的提取 取肝癌组织约 10 mg，按 Qiangen 公司的 QIAamp DNA Mini Kit 说明书取肝组织中的 DNA。提取的 DNA 用 PSAD 酶 37 ℃处理过夜，降解肝组织中的 HBV RcDNA，以得到 HBV cccDNA。

1.2.2 荧光定量 PCR 检测肝组织中 HBV cccDNA 和 HBV DNA HBV RcDNA 的负链 DR1 和 DR2 区域之间存在缺口区（nick），因此利用 Tagman 探针法可特异性扩增 HBV cccDNA[5]，特异性引物和探针序列（表 1）。荧光定量 PCR 检测 HBV cccDNA 和 HBV DNA 的条件分别为 HBV cccDNA：95 ℃预变性 10 min，98 ℃ 10 s，58 ℃ 5 s，60 ℃ 10 s，72 ℃ 20 s，40 个循环；HBV DNA：95 ℃预变性 10 min，95 ℃ 10 s，58 ℃ 15 s，72 ℃ 10 s，40 个循环；同时采用 β-Globin 作为内参。

1.3 统计分析

所有的统计检验分析均采用 R 语言编程实现。病例患者临床指标数值均以均数± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示；组间非连续变量（计数变量）的比较采用校正的卡方检验，连续变量（数值变量）的比较采用组间的 t 检验；关联性分析均采用 Pearson 相关分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 病人临床信息统计

26 例 HCC 病人样本临床信息如表 1 所示，其中 HBeAg 阴性为 12 例，HBeAg 阳 14 例。通过对 e 抗原阴性和阳性的组间统计学检验比较，本文发现性别、HBsAg（表面抗原）、HBcAb（乙肝核心抗体）和血清中的 HBV DNA 在 e 抗原阴性和阳性组间无统计学差异；而年龄、AFP（甲胎蛋白）有统计学差异（表 2）。

表 1 荧光定量探针法的引物和探针

Tab.1 HBV-specific primers and probe used

引物或探针	序列（5'-3'）	位置
HBV DNAFP	TGCGGCGTTTTATCATATTCC	384~395
HBV DNARP	ATACCTTGGTAGTCCAGAAGAACCA	414~438
DNA probe	FAM TTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTG- TAMRA	407~437
HBV cccDNAFP	CTCCCCGTCTGTGCCTTCT	1 548~1 566
HBV cccDNARP	GCCCCAAAGCCACCCAAG	1 903~1 886
cccDNA probe	FAM- ACGTCGCATGGAGACCACCGTGAACGCC- TAMRA	1 603~1 630
GlobinFP	ACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTT	1 867~1 890
GlobinRP	GCCATGAGCCTTCACCTTAGG	1 947~1 927
Globinprobe	FAM- TCCACTCCTGATGCTGTTATGGGCAA- TAMRA	1 888~1 914

表 2 病人临床信息列表（h，$\bar{x} \pm s$）

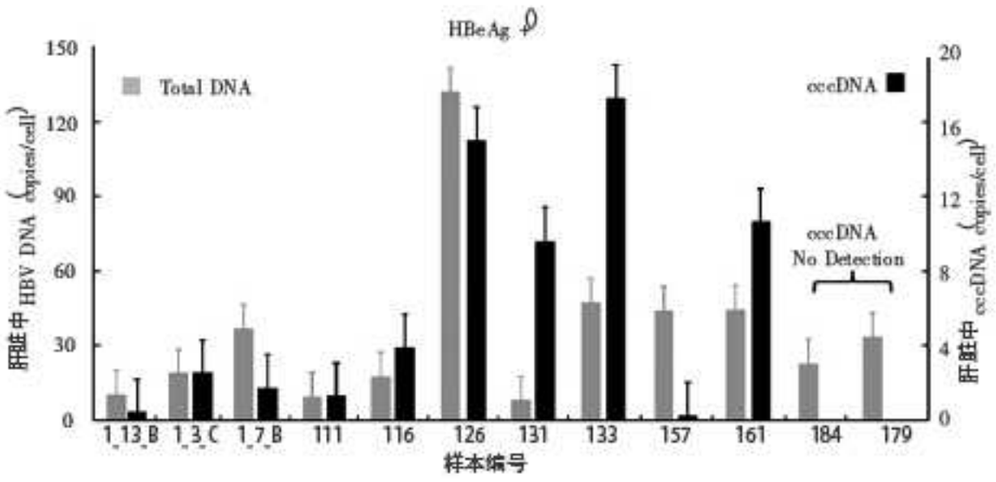
Tab.2 Clinical information of patients（h，$\bar{x} \pm s$）

指标	总体（26）	HBeAg阴性（14）	HBeAg阳性（12）	χ^2/t 值	P 值
性别[男/女]	25/1	13/1	12/0	0.006	0.937[b]
HBsAg[-/+]	2/24	2/12	0/12	0.390	0.532[b]
HBcAb[-/+]	1/25	1/13	0/12	0.006	0.937[b]
年龄（岁）	51.88± 13.81	58.86± 10.15	43.75± 13.32	-3.210	0.004[a]
AFP（ng/ml）	20 905.71± 96 653.31	2 228.52± 7 797.49	44 676.69± 145 710.29	0.965	0.046[a]
血清 HBV DNA（log copy/ml）	4.15± 1.20	4.398± 1.08	4.458± 1.34	0.923	0.376[a]

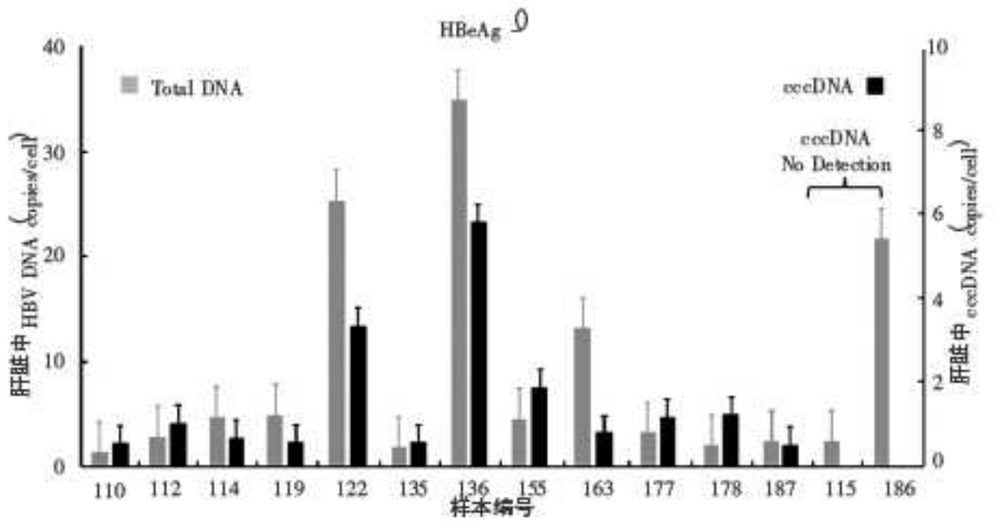
注：a，t 检验；b，校正的卡方检验

2.2 肝癌组织中 HBV cccDNA 和 DNA 表达水平检测和区间分布

本文进一步检测了每个样本中 HBV DNA 与 cccDNA 的表达水平，如图 1 所示：在 26 例 HCC 样本中，肝组织 HBV DNA 表达水平的检出率为 100%，而 cccDNA 在 HBeAg 阳性和 HBeAg 阴性样本中的检测率分别为 83.3%（10/12）和 85.71%（12/14）。从表达水平的分布区间来看，HBV DNA 和 cccDNA 在 HBeAg 阳性样本的表达水平的分布范围和分布区间均趋向于较高数值（图 2）：HBeAg 阳性样本肝组织中 HBV DNA 表达值分布范围为 0~150 copy/cell，其中超过 58%的样本（7/12）表达水平分布在高于 20 copy/cell 的高值区间，同时 cccDNA 表达值分布范围为 0~20 copy/cell，50%的样本（6/12）分布于 2 copy/cell 以上的区域；而在 HBeAg 阴性样本中，肝组织中 HBV DNA 和 cccDNA 的分布范围相对较小，主要分布在 10 copy/cell 以下（71.4%，10/14）和 0~1 copy/cell（57.1%，8/14）的低值区间。



A. HBeAg 阳性样本肝组织 HBV DNA（灰色柱子）和 cccDNA（黑色柱子）表达水平



B. HBeAg 阴性样本肝组织 HBV DNA（灰色柱子）和 cccDNA（黑色柱子）表达水平

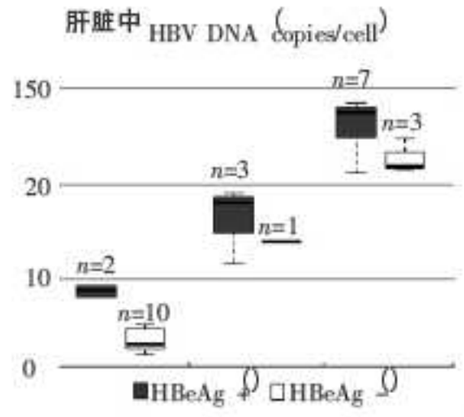
横坐标为样本编号名称

图 1 HCC 病人样本 HBeAg 阳性（A）和阴性（B）样本肝组织 HBV DNA(灰色柱子)和 cccDNA(黑色柱子)表达水平

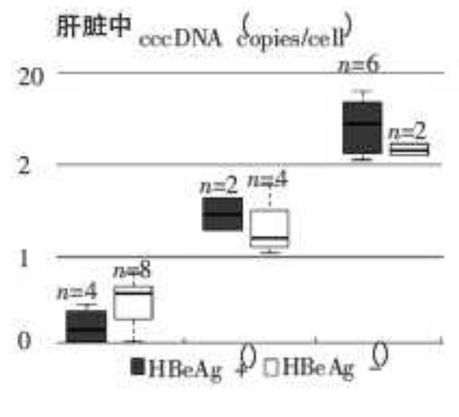
Fig.1 Intrahepatic HBV DNA (gray bar) and cccDNA (black bar) level in HBeAg positive (A) and negative (B) samples in HCC patients

2.3 肝癌组织中 HBV cccDNA 和 DNA 表达水平差异比较

本文进一步分析了肝组织中 HBV DNA 和 cccDNA 在 e 抗原阴性和阳性组表达水平的差异，结果表明 HBV DNA 和 cccDNA 在 e 抗原阴性组中表达水平明显低于阳性组（DNA：9.11 vs. 35.57 copy/cell，P=0.0214；cccDNA 1.53 vs. 6.27 copy/cell，P=0.044）（图 3A 和 B），而血清中 HBV DNA 在 2 组的表达水平没有统计学差异（P=0.376）（图 3C）。



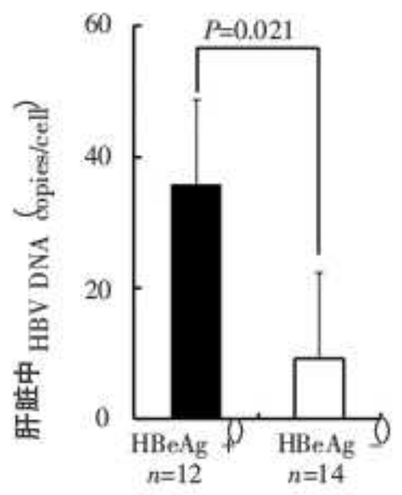
A. 肝组织中 DNA 在 HBeAg 阳性（灰色盒子）和 HBeAg 阴性（白色盒子）样本中表达水平的分布区间



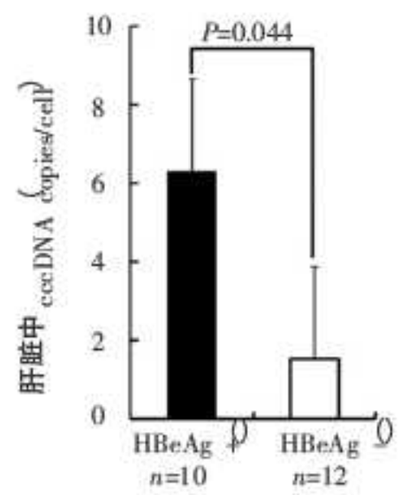
B. 肝组织中 DNA 在 HBeAg 阴性（灰色盒子）和 HBeAg 阴性（白色盒子）样本中表达水平的分布区间

图 2 肝组织中 DNA（A）和 cccDNA(B)在 HBeAg 阳性（灰色盒子）和 HBeAg 阴性（白色盒子）样本中表达水平的分布区间

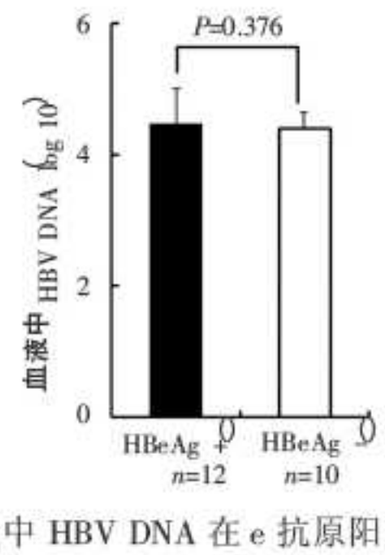
Fig.2 Distribution of Intrahepatic HBV DNA (A) and cccDNA (B) level in HBeAg positive (gray box) and HBeAg negative (white box) samples



A. 肝组织中 HBV DNA 在 e 抗原阳性（黑色）和阴性（白色）表达水平差异分析



B. 肝组织中 cccDNA 在 e 抗原阳性（黑色）和阴性（白色）表达水平差异分析



C. 血清中 HBV DNA 在 e 抗原阳性（黑色）和阴性（白色）表达水平差异分析

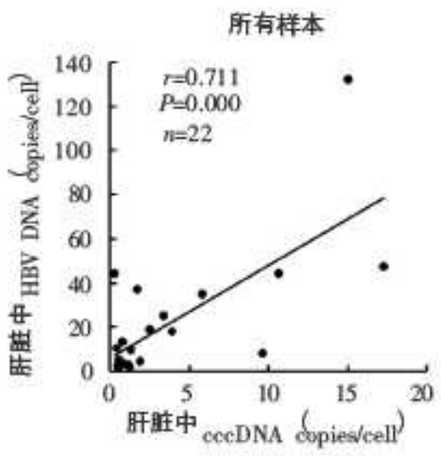
n表示样本的个数

图 3 肝组织中 HBV DNA（A）、cccDNA（B）和血清中 HBV DNA 在 e 抗原阳性（黑色）和阴性（白色）表达水平差异分析

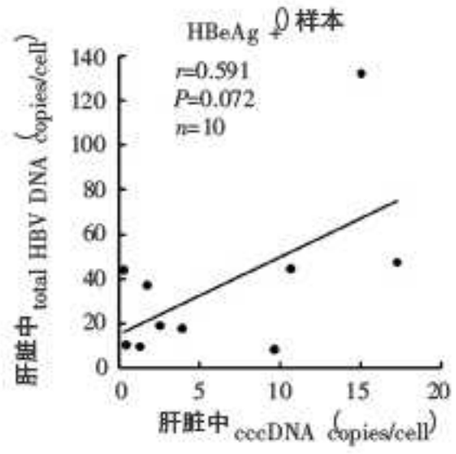
Fig.3 Analysis of intrahepatic HBV DNA(A), cccDNA(B) and serum HBVDNA(C) level difference in HBeAg positive(black bar) and negative (white bar) group

2.4 肝组织中 HBV cccDNA 与 DNA 之间相关性分析

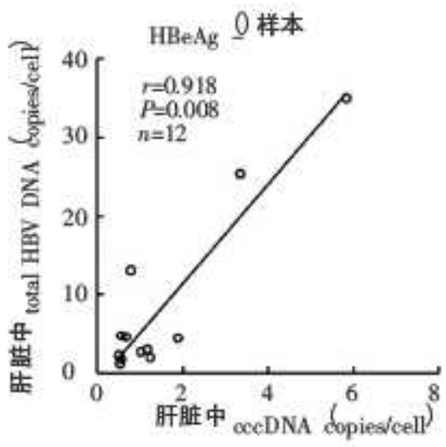
如图 4 所示，在所有样本中，cccDNA 与 DNA 显著正相关（r=0.711，P=0.0002）在 HBeAg 阴性样本中，cccDNA 与 DNA 显著正相关（r=0.918，P=0.000），而在 HBeAg 阳性组 cccDNA 与 DNA 无相关性（r=0.591，P=0.072）。



A. cccDNA 与 DNA 在所有样本中相关性分析图



B. cccDNA 与 DNA 在 e 抗原阳性样本中相关性分析图



C. cccDNA 与 DNA 在 e 抗原阴性样本中相关性分析图

图 4 cccDNA 与 DNA 在所有样本（A），e 抗原阳性（B）和阴性组（C）中相关性分析图

Fig.4 Correlation analysis between intrahepatic cccDNA and HBV DNA in whole samples (A), HBeAg positive samples (B) and HBeAg negative samples (C)

3 讨 论

HCC 至今仍然是当今世界常见的致命性癌症之一，且半数以上 HCC 的发生与 HBV 的感染相关。尽管 HBV 的感染诱发 HCC 的确切机制和原因尚不清楚，病毒感染整合到宿主基因组引起基因的不稳定，从而诱导 HCC 的发生[6]。此外，X 作为调控因子激活 NF-kB，PI-3K 等信号通路，导致 HCC 的发生[7]。尽管 HBV cccDNA 是否直接导致 HCC 的作用存在较大的争议，但研究 HCC 中 HBV cccDNA 的表达水平对于深入理解其在 HCC 发生过程中机制具有重要意义[8]。

在本研究中采用特异性荧光定量 Tagman 探针法检测了 26 例 HBV 感染的肝癌患者中 cccDNA 和 DNA 的表达水平，并分析了与 HBeAg 的相关性。本文的结果表明：①在肝癌样本中，发生 HBeAg 血清学转换的患者中，83.3%的患者肝内 cccDNA 仍然被检测出，并且肝内病毒 DNA 也同样被检出，表明尽管部分 HCC 患者中，HBeAg 发生了血清学转化，但是 cccDNA 和 DNA 仍然存在，表明病毒仍然存在复制。由于 HBeAg 阴转与 HBV 变异相关，特别是 preC 区的 G1896A 突变形成终止密码子，使得 HBeAg 表达终止[9]，因此本文将进一步分析发生 HBeAg 阴转的患者其 cccDNA 序列的突变与 cccDNA 表达水平的关系。②HCC 患者中，HBeAg 阳性样本中 cccDNA 和 DNA 的表达水平显著高于阴性样本，这与 Wong 等在对 HBV 慢性感染患者中研究中的结论一致[10]，表明 cccDNA 的表达水平和 HBeAg 水平密切相关。③HBeAg 阴性患者肝组织中 HBV cccDNA 与 DNA 的表达水平呈较强的正相关性（r=0.918），表明在 HBeAg 阴性的患者中，病毒复制水平的下降主要是来自于 cccDNA 水平的下降，而不是 cccDNA 表观水平的调控。

总的说来，本文的研究表明在 HBV 感染的肝癌患者中，HBV cccDNA 和 HBeAg 水平密切相关；同时要准确了解患者内病毒的复制情况，检测肝脏内 cccDNA 和 DNA 的表达水平可能是最准确的。

参 考 文 献

[1] Liaw YF，Chu CM.Hepatitis B virus infection[J].Lancet，2009，373(9663)：582-589.

[2] El HB，Rudolph KL.Hepatocellular carcinoma：epidemiology and molecular carcinogenesis[J].Gastroenterology，2007，132(7)：2557-2576.

[3] Papatheodoridis GV，Manolakopoulos S，Dusheiko G，et al.Therapeutic strategies in the management of patients with chronic hepatitis B virus infection[J].Lancet Infect Dis，2008，8(3)：167-178.

[4] Shepard CW，Simard EP，Finelli L，et al.Hepatitis B virus infection：epidemiology and vaccination[J].Epidemiol Rev，2006，28(1)：112-125.

[5] Werle-Lapostlle B，Bowden S，Locarnini S，et al.Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy[J].Gastroenterology，2004，126(7)：1750-1758.

[6] Murakami Y，Saigo K，Takashima H，et al.Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas[J].Gut，2005，54(8)：1162-1168.

[7] Ayub A，Ashfaq UA，Haque A.HBV induced HCC：major risk factors from genetic to molecular level[J].Biomed Res Int，2013，2013(1)：810461.

[8] Bai F，Yano Y，Takebe A，et al.Quantification of pregenomic RNA and covalently closed circular DNA in hepatitis Bvirus-related hepatocellular carcinoma[J].Int J Hepatol，2013，2013(1)：849290.

[9] Park YM，Jang JW，Yoo SH，et al.Combinations of eight key mutations in the X/preC region and genomic activity of hepatitis B virus are associated with hepatocellular carcinoma[J].Journal Viral Hepat，2014，1(3)：171-177.

[10] Wong DK，Yuen MF，Yuan H，et al.Quantitation of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients[J].Hepatology，2004，40(3)：727-737.

责任编辑：关蕴良）