

# 肝组织中 HBV cccDNA 荧光定量聚合酶链反应检测法的建立

王美容 邱宁 卢实春 修典荣 于建国 李彤 刘学恩 庄辉

**【摘要】** 目的 建立和优化一种灵敏、特异的检测肝组织中乙型肝炎(乙肝)病毒(HBV)共价闭合环状 DNA(cccDNA)荧光定量聚合酶链反应(荧光定量 PCR)。方法 设计检测 HBV DNA (tDNA)和 cccDNA 特异性引物及探针,用  $3.44 \times 10^0 \sim 3.44 \times 10^9$  copies/ $\mu$ l 含 HBV 全基因组序列(C 基因型)质粒作为标准品,建立荧光定量 PCR 检测标准曲线。取 33 例乙型肝炎患者肝组织标本、13 例慢性乙肝患者肝活检组织标本和 10 例非乙肝患者肝组织标本,验证该法灵敏度和特异度。提取肝组织中 DNA,取一部分进行质粒安全 ATP 依赖的 DNA 酶(PSAD)酶切;另一部分不酶切作为 tDNA 和  $\beta$ -globin 检测样本,分别进行 HBV cccDNA、tDNA 和  $\beta$ -globin 定量检测,以  $\beta$ -globin 为参比,对每个细胞的 HBV cccDNA 和 tDNA 含量进行标准化。结果 检测肝组织中 HBV cccDNA 和 tDNA 定量的线型范围均为  $3.44 \times 10^0 \sim 3.44 \times 10^9$  copies/ $\mu$ l。检测 HBV cccDNA 和 HBV DNA 下限均为  $3.44 \times 10^0$  copies/ $\mu$ l。33 例乙型肝炎患者和 13 例慢性乙肝患者的肝组织中 HBV cccDNA 最低含量分别为 0.003 copies/cell 和 0.031 copies/cell;检测 10 份非乙型肝炎患者的肝组织标本均为阴性。应用 PSAD 消化肝组织中提取的 DNA 可减少假阳性,提高 cccDNA 检测法特异度达  $7.24 \times 10^2$  倍。对 2 例乙型肝炎患者的肝组织标本重复检测 5 次, Ct 值的变异系数为 0.224% ~ 0.609%。结论 该方法灵敏度和特异度高,重复性好,可用于检测肝组织中 HBV cccDNA。

**【关键词】** 乙型肝炎病毒; 共价闭合环状 DNA(cccDNA); 实时荧光定量聚合酶链反应

**A quantitative real time polymerase chain reaction for detection of HBV covalently closed circular DNA in livers of the HBV infected patient** WANG Mei-rong<sup>1</sup>, QIU Ning<sup>1</sup>, LU Shi-chun<sup>2</sup>, XIU Dian-rong<sup>3</sup>, YU Jian-guo<sup>4</sup>, LI Tong<sup>1</sup>, LIU Xue-en<sup>1</sup>, ZHUANG Hui<sup>1</sup>. 1 Department of Microbiology, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China; 2 Department of Hepatobiliary Surgery & Liver Transplantation Center, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University; 3 Department of Surgery, Peking University Third Hospital; 4 The 88th Hospital of People's Liberation Army  
Corresponding authors: LIU Xue-en, Email: xueenliu@bjmu.edu.cn; ZHUANG Hui, Email: zhuangbmu@126.com

This work was supported by a grant from the "Eleventh Five-Year Special Grand Projects" for Infectious Disease (No. 2009ZX10004-314, 2008ZX10002-004).

**【Abstract】 Objective** To establish and optimize a sensitive and specific quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) method for detection of hepatitis B virus covalently closed circular DNA (HBV cccDNA) in liver tissue. **Methods** Specific primers and probes were designed to detect HBV DNA (tDNA) and cccDNA. A series of plasmids ( $3.44 \times 10^0$ – $3.44 \times 10^9$  copies/ $\mu$ l) containing a full double-stranded copies of HBV genome (genotype C) were used to establish the standard curve of real-time PCR. Liver samples of 33 patients with HBV related hepatocellular carcinoma (HCC), 13 Chronic hepatitis B patients (CHB) and 10 non-HBV patients were collected to verify the sensitivity and specificity of the assay. A fraction of extracted DNA was digested with a Plasmid-Safe ATP-dependent Dnase (PSAD) for HBV cccDNA detection and the remaining was used for tDNA and  $\beta$ -globin detection. The amount (copies/cell) of HBV cccDNA and tDNA were measured by a real-time PCR, using  $\beta$ -globin housekeeping gene as a quantitation standard. **Results** The standard curves of real-time PCR with a linear range of  $3.44 \times 10^0$  to  $3.44 \times 10^9$  copies/ $\mu$ l were

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.05.019

基金项目:“十一五”国家科技重大专项(2009ZX10004-314, 2008ZX10002-004)

作者单位: 100191 北京大学医学部病原生物学系(王美容、邱宁、李彤、刘学恩、庄辉); 首都医科大学附属佑安医院外科(卢实春); 北京大学附属第三医院外科(修典荣); 解放军第 88 医院(于建国)

通信作者: 刘学恩, Email: xueenliu@bjmu.edu.cn; 庄辉, Email: zhuangbmu@126.com

established for detecting HBV cccDNA and tDNA, and both of the lowest detection limits of HBV cccDNA and tDNA were  $3.44 \times 10^0$  copies/ $\mu$ l. The lowest quantitation levels of HBV cccDNA in liver tissues tested in 33 HBV related HCC patients and 13 CHB patients were 0.003 copies/cell and 0.031 copies/cell, respectively. HBV cccDNA and tDNA in liver tissue of 10 non-HBV patient appeared to be negative. The true positive rate was increasing through the digestion of HBV DNA by PSAD, and the analytic specificity of cccDNA detection improved by  $7.24 \times 10^2$  times. Liver tissues of 2 patients were retested 5 times in the PCR for detecting cccDNA and the coefficient of variations on cycle threshold (*Ct*) were between 0.224%–0.609%. **Conclusion** A highly sensitive and specific quantitative real time PCR method for the detection of HBV cccDNA in liver tissue was established and could be used for clinical and epidemiological studies.

**[Key words]** Hepatitis B virus; HBV DNA; Covalently closed circular DNA; Real-time PCR

目前以核苷(酸)类似物和干扰素为代表的乙型肝炎(乙肝)抗病毒药物,多数能有效抑制病毒复制,降低外周血病毒载量<sup>[1,2]</sup>,但停药后可能复发,其主要原因是HBV复制过程中形成HBV共价闭环状DNA(cccDNA),在宿主肝细胞核内积聚,形成HBV cccDNA池<sup>[3]</sup>,由于其半衰期长,现有抗病毒药物不能清除,是产生耐药和停药后反跳的重要原因<sup>[4,5]</sup>。有报道<sup>[6-8]</sup>,肝组织中HBV cccDNA水平与抗病毒治疗的疗效和持续应答有关。因此HBV cccDNA的定量检测对临床抗病毒疗效监测和治疗方案的调整等具有重要意义。目前检测血清和外周血单核细胞(PBMC)中HBV cccDNA报道较多,而对肝组织中HBV cccDNA检测的报道较少,这与肝组织特别是肝活检组织标本不易采集有关。本研究根据HBV DNA(tDNA)和cccDNA的结构特点,设计特异性引物和探针,应用质粒安全ATP依赖的DNA酶(PSAD)酶切,以 $\beta$ -globin为参比,对每个细胞的HBV cccDNA含量进行标准化,应用实时聚合酶链反应(荧光定量PCR)检测肝组织中HBV cccDNA含量。

## 材料与方法

### 一、方法的建立

1. 设计tDNA、HBV cccDNA引物和探针:参考Singh等<sup>[9]</sup>设计的引物及探针碱基序列,扩增tDNA引物探针(t-Taqman)能够检测松弛环状DNA(relaxed circular DNA, rcDNA)与cccDNA,扩增片段长度为376 bp。根据rcDNA(有缺口)与cccDNA(闭合环状)的结构差异,设计跨rcDNA缺口引物,不扩增rcDNA,只检测出cccDNA,扩增片段长度为367 bp。引物和探针均位于HBV基因型A~G保守区域,应用BLAST软件(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)对设计的引物进行了验证。引物和探针由上海基康生物公司合成。序列见表1。

2. 制备标准质粒DNA(重组质粒

表1 引物及探针序列

| 引物/探针    | 序列(5'~3')                             | 位置        |
|----------|---------------------------------------|-----------|
| tDNA引物   |                                       |           |
| t-F      | GCCAAAATTCGCAGTCC                     | 305~321   |
| t-R      | AAACTGAGCCAGGAGAAA                    | 680~663   |
| t-Taqman | FAM-TTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGC<br>C-BHQ | 403~427   |
| cccDNA引物 |                                       |           |
| c-F      | GGGGCGCACCTCTCTTTA                    | 1523~1540 |
| c-R      | AGGCACAGCTTGGAGGC                     | 1890~1874 |
| c-Taqman | FAM-TTCTCATCTGCCGGACCGTG-BHQ          | 1562~1581 |

pBB4.5HBV1.2):以pBlueBac4.5为基础构建,包含有HBV DNA 1.2倍基因组长度,C基因型,adr亚型,涵盖HBV基因组1389~3215 nt和1~1969 nt序列(本实验室保存)。质粒培养后用质粒提取试剂盒(上海生物技术有限公司)提取,用紫外分光光度仪(美国GE公司GeneQuant pro)在260 nm波长下检测质粒总浓度(C  $\mu$ g/ml)及纯度。根据质粒DNA的分子量(M)及阿伏伽德罗常数(A)计算出质粒DNA的拷贝数(copies/ $\mu$ l=C/M $\times$ A),用双蒸水进行10倍稀释为 $10^9 \sim 10^0$  copies/ $\mu$ l 10个浓度作为标准品,建立cccDNA、tDNA检测标准曲线。原浓度质粒标准品于-20  $^{\circ}$ C保存备用。

3. 荧光定量PCR反应体系和条件:应用质粒标准品建立标准曲线,每个浓度的质粒分别用cccDNA和tDNA引物探针检测。①检测cccDNA的反应体系:2  $\mu$ l提取的DNA经PSAD酶切后产物作为模板,c-F(10 mmol/L) 0.8  $\mu$ l, c-R(10 mmol/L) 0.8  $\mu$ l, c-Taqman(10 mmol/L) 0.4  $\mu$ l, 2 $\times$  conc. lightcycler 480 probe master [FastStart Taq DNA Polymerase, reaction buffer, dNTP mix(用dUTP代替dTTP), 6.4 mmol/L MgCl<sub>2</sub>] 10  $\mu$ l, PCR水或灭菌双蒸水(ddH<sub>2</sub>O) 6  $\mu$ l, 总反应体系20  $\mu$ l。反应循环参数(lightcycler 480 system, Roche公司):95  $^{\circ}$ C预变性10 min;95  $^{\circ}$ C 10 s, 55  $^{\circ}$ C 20 s, 72  $^{\circ}$ C 20 s, 扩增45个循环。②检测tDNA的反应体系:2  $\mu$ l提取的DNA未用PSAD酶切样本作为模板,t-F(10 mmol/L)

0.8  $\mu\text{l}$ , t-R (10 mmol/L) 0.8  $\mu\text{l}$ , t-Taqman (10 mmol/L) 0.4  $\mu\text{l}$ , 其余试剂和剂量均同 cccDNA 反应体系, 反应循环参数同 cccDNA 检测。

4.  $\beta$ -globin 的检测:  $\beta$ -globin 是人类基因组 DNA (hg DNA) 上的一种管家基因。用 LightCycler Control Kit DNA (Roche DNA Control Kit; Roche Diagnostics) (含有引物探针) 和 LightCycler<sup>®</sup> 480 Genotyping Master (Roche) 试剂盒检测肝组织中的  $\beta$ -globin, 得知 hg DNA 含量, 计算出肝组织细胞数 (每个细胞约含 6.667 pg 的 hg DNA)<sup>[10]</sup>, 对检测的 cccDNA 和 tDNA 进行标准化, 以  $\beta$ -globin 为参比, 获得每个细胞的拷贝数。

## 二、标本采集和核酸提取

1. 标本: 33 例乙型肝炎患者 (肝组织中 HBV DNA 均为阳性), 其中男性 27 例, 女性 6 例, 年龄 26 ~ 74 岁, 取自北京大学附属第三医院和北京佑安医院。本研究取该 33 例患者的肝癌组织和配对的癌旁组织检测。13 例慢性乙肝患者 (血清 HBV DNA 均为阳性) 的肝活检组织来自解放军第 88 医院, 其中男性 9 例, 女性 4 例, 年龄 17 ~ 68 岁。10 例非乙肝患者 (血清 HBV 标志物均为阴性) 的肝组织标本作为阴性对照, 分别来自河南省肿瘤医院、北京大学附属第三医院和北京佑安医院, 其中男性 2 例, 女性 8 例, 年龄 33 ~ 74 岁。所有肝组织标本均置 -70 °C 冰箱保存备检。

2. 标本的 DNA 提取: 取约 20 mg 的肝癌组织或癌旁组织, 在液氮中研磨呈粉末状, 按照 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) 说明书, 稍作修改 (取 600  $\mu\text{l}$  AW1 buffer 分 2 次进行洗涤, 每次 300  $\mu\text{l}$ ), 提取 DNA。肝活检组织按照 QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) 说明书提取。应用紫外分光光度计在 260 nm 波长下测定 DNA 浓度, 置 -20 °C 冰箱保存。

3. DNA 的 PSAD 酶切: PSAD (Epicentre Technologies, Madison, WI) 在弱碱性 pH 条件下消化线性双链 DNA、线性单链 DNA 和环状单链 DNA, 对闭合环状双链 DNA 或超螺旋 DNA 无活性。取 25  $\mu\text{l}$  DNA 加入 1  $\mu\text{l}$  PSAD (10 U/ $\mu\text{l}$ )、10 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ 、1 mmol/L ATP、0.5 mmol/L DTT 配成 50  $\mu\text{l}$  弱碱性体系, 于 37 °C 水浴 1 h 酶切消化, 然后 70 °C 水浴 30 min 灭活 PSAD 酶。终产物作为检测 cccDNA 的反应模板。

4. 检测 DNA 提取效率和纯化效果: 取非乙肝肝癌患者的肝组织, 核酸提取时加入已知量的标准质粒, 对未加质粒和加了标准质粒标本提取的 DNA 进

行 PSAD 酶消化, 酶切产物用 cccDNA 引物探针进行荧光定量 PCR 检测, 其结果与已知量标准质粒结果比较, 检测提取效率。将已知浓度标准质粒酶切后纯化 (Biospin PCR 产物纯化试剂盒, Bio-Rad 公司产品) 产物, 与酶切未纯化和同等量的标准质粒用 cccDNA 引物探针进行 Rt-PCR, 比较其结果, 检测纯化的必要性。

## 三、灵敏度、特异度和重复性检测

1. 灵敏度: 标准质粒 DNA 倍比稀释为 11 个浓度 ( $10^{10}$  ~  $10^0$  copies/ $\mu\text{l}$ ), 用 cccDNA 引物及探针进行荧光定量 PCR, 根据扩增曲线的扩增效率及线性关系检测其灵敏度。扩增效率是根据 Lightcycler 480 System 的标准曲线扩增效率得到的, 即  $E = 10^{-1/\text{斜率}}$ , 扩增效率用百分率表示, 即 %效率 =  $(E/2) \times 100\%$ 。

2. 特异度: 取非乙肝肝癌患者的肝组织作为阴性对照标本, 加已知量的标准质粒提取 DNA, 检测 PSAD 酶切前后产物。检测 HBV 阳性肝组织标本 PSAD 酶切前后产物及阳性标本加已知量标准质粒的 PSAD 酶切前后产物。验证 PSAD 对 rcDNA 的作用及 cccDNA 引物和探针的特异度。cccDNA 特异度倍数是通过 HBV cccDNA 标准曲线计算, 即  $Y = -3.472X + 41.34$  ( $X$  代表标本浓度的对数,  $Y$  代表  $C_t$  值), 酶切前、后标本用 cccDNA 引物探针进行检测获得  $C_t$  值, 取标本的  $C_t$  值相差最大的两个值代入标准曲线中, 得出标本原始浓度, 然后两者进行比较。

3. 重复性: 取 3 个浓度 ( $10^3$ 、 $10^5$ 、 $10^7$  copies/ $\mu\text{l}$ ) 的质粒标准品及 2 例 HBsAg 阳性患者的肝癌组织和癌旁组织分别做 5 或 6 个重复孔检测, 观察 PCR 内的重复性及变异系数 (CV%); 同时对 1 例 HBsAg 阳性患者的肝癌组织及癌旁组织进行 3 次定量 PCR 检测, 观察重复性及 CV%。

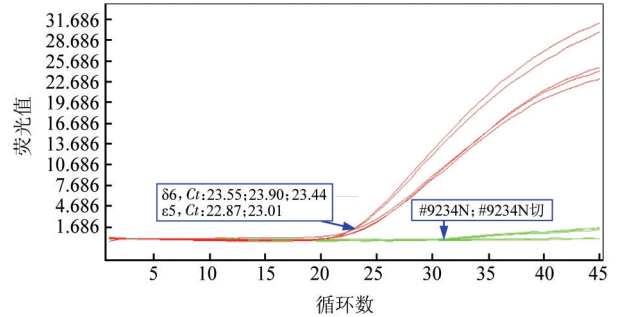
## 结 果

1. 检测肝组织 cccDNA 和 tDNA 标准曲线的建立: 检测 cccDNA 标准曲线为  $Y = -3.472X + 41.34$ , 线性范围为  $3.44 \times 10^0$  ~  $3.44 \times 10^9$  copies/ $\mu\text{l}$ , 扩增效率百分率为 97% (图 1); 检测 tDNA 标准曲线为  $Y = -3.432X + 41.56$ , 线性范围为  $3.44 \times 10^0$  ~  $3.44 \times 10^9$  copies/ $\mu\text{l}$ , 扩增效率百分率为 98% (图 2)。

2. 提取效率和纯化效果检验: 阴性对照组织中加入已知量 ( $10^6$  copies/ $\mu\text{l}$ ) 标准质粒后提取 DNA, 相当于标准质粒 10 倍稀释, 酶切时再稀释 2 倍, 然后与 2 倍稀释的  $10^5$  copies/ $\mu\text{l}$  标准质粒样本进行荧光定量 PCR, 两者  $C_t$  值分别为  $23.63 \pm 0.24$  和  $22.94 \pm 0.10$ ,

说明酶切后不纯化对cccDNA的正常扩增无影响。纯化可导致大量DNA丢失,不能准确检测出样本中HBV DNA含量,因此,不采用酶切后纯化(图4)。

3. 特异度分析:非乙肝患者肝癌组织及癌旁组织中均未检出cccDNA和HBV DNA,乙肝后肝癌患



注: δ6: 阴性对照肝组织中加入 $10^6$  copies/ $\mu$ l的标准质粒PSAD酶切后样本; ε5:  $10^5$  copies/ $\mu$ l的标准质粒2倍稀释样本; #9234N、#9234N切分别表示阴性对照肝组织PSAD酶切前后样本

图3 提取效率检验

图1 检测肝组织cccDNA荧光定量PCR扩增曲线(A)和标准曲线(B)

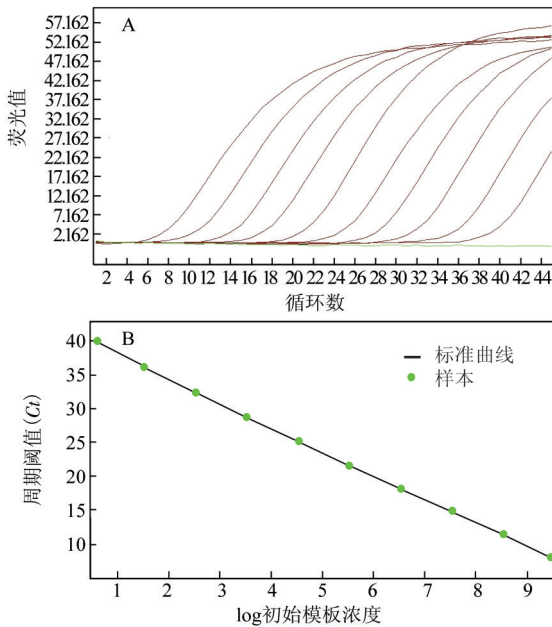
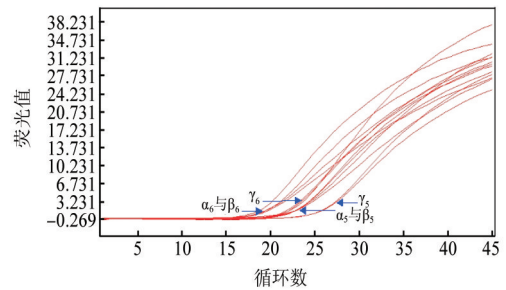


图2 检测HBV tDNA荧光定量PCR扩增曲线(A)和标准曲线(B)

说明组织提取效率良好(图3)。对已知量( $10^6$ 与 $10^5$  copies/ $\mu$ l两组)的标准质粒样本PSAD酶切后产物(相当于稀释了2倍)进行纯化,与同等量2倍稀释的标准质粒样本进行PCR比较;纯化组 $10^6$  copies/ $\mu$ l与 $10^5$  copies/ $\mu$ l Ct值分别为 $21.88 \pm 0.09$ 和 $26.13 \pm 0.10$ ,标准质粒组分别为 $19.39 \pm 0.60$ 和 $23.04 \pm 0.11$ ,可见纯化后大量DNA丢失,DNA浓度下降,Ct值上升;而PSAD酶切后未纯化样本Ct值分别为 $19.42 \pm 0.00$ 和 $23.18 \pm 0.18$ ,与标准质粒组比较,基本一致,



注:  $\alpha_6$ 、 $\alpha_5$ 分别表示 $10^6$  copies/ $\mu$ l与 $10^5$  copies/ $\mu$ l标准质粒2倍稀释样本;  $\beta_6$ 、 $\beta_5$ 分别表示 $10^6$  copies/ $\mu$ l与 $10^5$  copies/ $\mu$ l标准质粒PSAD酶切后标本;  $\gamma_6$ 、 $\gamma_5$ 分别表示 $10^6$  copies/ $\mu$ l与 $10^5$  copies/ $\mu$ l标准质粒PSAD酶切后纯化标本

图4 纯化效果检验

者肝组织中均能检测到cccDNA和HBV DNA,说明荧光定量检测方法的特异度较好(图3)。

由于rcDNA正负链5'端的部分重叠互补,尤其在rcDNA含量很高的情况下检测cccDNA,很容易导致假阳性,所以采用PSAD酶对tDNA样本消化,去除rcDNA的影响。为了验证PSAD酶作用的特异性,取 $3.44 \times 10^5/\mu$ l与 $3.44 \times 10^6/\mu$ l标准质粒进行PSAD酶切,与2倍稀释原浓度标准质粒同时进行cccDNA定量检测,前者Ct值分别为 $23.18 \pm 0.18$ 和 $19.42 \pm 0.00$ ;后者Ct值分别为 $23.04 \pm 0.11$ 和 $19.39 \pm 0.60$ ,可见PSAD酶不会消化降解cccDNA(图4)。

用tDNA引物及探针1例HBsAg阳性乙肝后肝癌患者癌组织及癌旁组织酶切前后产物进行定量PCR,结果肝癌组织及癌旁组织酶切前的Ct值分别为 $23.80 \pm 0.15$ 和 $26.64 \pm 0.02$ ,酶切后的Ct值分别为 $26.12 \pm 0.11$ 和 $34.98 \pm 0.14$ ,可见酶切前浓度大于酶切

后,说明 PSAD 酶能消化降解 rcDNA,增加了检测 cccDNA 特异度。用 cccDNA 引物及探针检测 2 例 HBsAg 阳性乙肝后肝癌患者肝癌组织及癌旁组织酶切前的 Ct 值分别为 27.42 ± 0.09 和 26.83 ± 0.03, 27.14 ± 0.03 和 26.68 ± 0.03;酶切后的 Ct 值分别为 33.60 ± 0.17 和 31.97 ± 0.07, 37.07 ± 0.97 和 33.63 ± 0.06;可见 PSAD 酶切可提高 cccDNA 检测特异度达 7.24 × 10<sup>2</sup> 倍。

4. 灵敏度分析:从检测 cccDNA 和 tDNA 荧光定量 PCR 标准曲线可见,曲线线性关系和扩增效率良好:线性范围为 3.44 × 10<sup>0</sup> ~ 3.44 × 10<sup>9</sup> copies/μl,扩增效率为 97% ~ 98%,最低检测下限是 3.44 × 10<sup>0</sup> copies/μl,检测肝组织标本中 cccDNA 最低含量为 0.003 copies/cell。

5. 重复性分析:标准质粒 3 个浓度 (10<sup>3</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>7</sup> copies/μl) 及 1 例 HBsAg 阳性患者 (# 1032) 肝癌组织和癌旁组织标本进行 5 或 6 个重复孔的 cccDNA 检测, Ct 值分别为 29.29 ± 0.10、21.85 ± 0.08、14.70 ± 0.05、33.60 ± 0.17 和 31.97 ± 0.07, CV% 分别为 0.352%、1.928%、0.362%、0.502% 和 0.224%。样本 # 3386 的肝癌组织及癌旁组织分别进行 3 次定量 PCR 检测, Ct 值分别为 25.97 ± 0.17 和 35.16 ± 0.16, CV% 分别为 0.661% 和 0.458%,可见荧光定量 PCR 法重复性良好(表 2)。

6. 临床标本检测:10 例非乙肝患者肝组织均未检测到 cccDNA 和 HBV DNA。2 例 HBsAg 和血清 HBV DNA 均阴性的肝癌患者肝组织中均检测到 cccDNA 和 HBV DNA,肝癌组织 cccDNA 和 tDNA 含量分别为 (0.004 和 0.116、0.010 和 0.030) copies/cell,癌旁组织 cccDNA 和 tDNA 含量分别为 (0.007 和 0.147、0.009 和 0.036) copies/cell。目前检测的 33 例 HBsAg 阳性肝癌患者中,1 例癌组织中检测到 cccDNA 最低含量为 0.003 copies/cell, tDNA 为 0.007 copies/cell;另 1 例癌组织检测到 cccDNA 最高含量为 27.110 copies/cell, tDNA 为 1255.083 copies/

cell。13 例慢性乙肝患者肝活检组织中 cccDNA 和 HBV tDNA 水平中位数值分别为 0.393 (0.031 ~ 6.482 copies/cell) 和 6.199 (0.195 ~ 1403.120 copies/cell),两者对数值水平有显著相关性 (r=0.740, P=0.004);分别与血清 HBV DNA 对数值水平呈显著相关性 (r=0.889, P<0.05; r=0.849, P<0.05),与 ALT 水平相关性不大 (P>0.05)。

### 讨 论

HBV cccDNA 是该病毒在宿主肝细胞内建立感染状态和病毒复制最重要的标志之一。肝细胞内 cccDNA 的存在是慢性乙肝抗病毒治疗过程中产生药物耐受和停药反跳的重要原因<sup>[4, 5, 12]</sup>,血清 HBV DNA 水平不能真实反映肝组织内 HBV 感染及复制情况,因此建立一种灵敏、特异、可靠的方法检测肝组织内 cccDNA 和 HBV DNA 有非常重要意义。检测 cccDNA 的技术不断发展,从复杂 Southern blot 法到巢式聚合酶链反应,嵌合引物两步法荧光定量<sup>[12]</sup>、选择性实时荧光定量 PCR 扩增法<sup>[9]</sup>、非 PCR 扩增法-侵入式检测法<sup>[10]</sup>等,结合 PSAD、S1 酶、绿豆核酸酶等对 ssDNA、rcDNA、整合 DNA 等其他形式的 DNA 进行消化,不断提升检测的灵敏度、特异度。每种方法均有其长处和不足,例如:嵌合引物两步法进行两次 PCR,增加了外源性污染的机会,同时增加了分析数据结果的难度;侵入式检测法的反应体系及过程过于复杂,不利于掌控。

本研究参考 Singh 等<sup>[9]</sup>建立的实时荧光定量 PCR,引用该研究设计的特异性引物和探针序列,用广泛应用的 Taqman 水解探针代替双杂交探针,通过优化反应体系和条件,建立了检测 cccDNA 和 HBV DNA 线性关系良好的标准曲线。Singh 等<sup>[9]</sup>设计的引物是通过比较 A ~ F 6 个基因型得出的高保守片段,实际应用于临床标本检测时,可将大部分基因型的标本检出。为增强 cccDNA 检测的特异度,本研究采用了 PSAD 酶消化肝组织 tDNA, PSAD 酶对 ssDNA、rcDNA、整合的 DNA 等具有消化作用,而对 cccDNA 无作用,从而大幅度提高了方法的特异度至 7.24 × 10<sup>2</sup> 倍。同时,设计内部参照,检测肝组织中 β-globin 基因含量,计算出不同样本所含细胞数,将 HBV DNA 和 cccDNA 定量为每个细胞的拷贝数,从而使组织构成异质性较大的样本具有良好的可比性。Singh 等<sup>[9]</sup>

表 2 荧光定量 PCR 重复性检测结果

|                        | Ct 值  |       |       |       |       | $\bar{x} \pm s$ | CV(%)        |       |       |              |       |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------|--------------|-------|-------|--------------|-------|
| 质粒浓度(copies/μl)        |       |       |       |       |       |                 |              |       |       |              |       |
| 3.44 × 10 <sup>7</sup> | 14.72 | 14.76 | 14.69 | 14.73 | 14.62 | 14.70 ± 0.05    | 0.362        |       |       |              |       |
| 3.44 × 10 <sup>5</sup> | 21.74 | 21.94 | 21.91 | 22.80 | 21.87 | 21.85 ± 0.08    | 1.928        |       |       |              |       |
| 3.44 × 10 <sup>3</sup> | 29.19 | 29.25 | 29.23 | 29.36 | 29.44 | 29.29 ± 0.10    | 0.352        |       |       |              |       |
| 样本编号                   |       |       |       |       |       |                 |              |       |       |              |       |
| #1032T <sup>b</sup>    | 33.75 | 33.61 | 33.65 | 33.49 | 33.78 | 33.33           | 33.60 ± 0.17 | 0.502 |       |              |       |
| #1032NT <sup>a</sup>   | 31.95 | 32.06 | 31.98 | 31.86 | 31.92 | 32.01           | 31.97 ± 0.07 | 0.224 |       |              |       |
| #3386T <sup>b</sup>    | 26.02 | 26.09 | 25.98 | 25.69 | 26.04 |                 | 25.96 ± 0.16 | 0.609 |       |              |       |
| #3386NT <sup>a</sup>   | 35.21 | 35.32 | 35.35 | 35.49 | 35.64 |                 | 35.40 ± 0.17 | 0.470 |       |              |       |
| #3386T <sup>c</sup>    | 26.00 | 26.23 | 26.13 | 25.69 | 25.83 | 25.78           | 26.02        | 25.98 | 26.04 | 25.97 ± 0.17 | 0.661 |
| #3386NT <sup>c</sup>   | 35.00 | 34.83 | 35.12 | 35.20 | 35.20 | 35.22           | 35.21        | 35.32 | 35.35 | 35.16 ± 0.16 | 0.458 |

注:T、NT 分别表示肝癌组织、癌旁组织;<sup>a、b、c</sup>分别表示 PCR 内和 PCR 间的重复性检测

检测方法的最低下限是 $2.5 \times 10^1$ 拷贝/反应,检测到肝细胞内最低cccDNA水平是0.05 copies/cell;本研究的检测范围是 $3.44 \times 10^0 \sim 3.44 \times 10^9$  copies/ $\mu$ l,检测到肝细胞内最低cccDNA含量为0.003 copies/cell,可见本研究的检测下限低于Singh等方法,灵敏度更高。其原因是:Singh等在PSAD酶处理后,对酶切后标本纯化,可能产生两种不利影响:①使原本含量就较低的cccDNA进一步丢失,导致假阴性;②不同的样本进行该处理时,cccDNA丢失程度可能不同,影响了结果的可比性。本研究通过对已知量的标准质粒酶切前后未纯化及酶切后纯化比较,发现前两者结果基本一致,而酶切后纯化则明显降低核酸浓度,说明酶切后样本不需纯化,不纯化对cccDNA的检测无显著影响,并能更准确反映样本中核酸含量。对3个浓度的标准品及阳性标本的多个重复孔及同一样本的多次PCR来检测,其变异系数分别为0.352%、1.928%、0.362%、0.502%、0.224%、0.661%和0.458%,可见重复性良好。

本研究在非乙肝后肝癌患者肝组织中未检测到cccDNA,说明本检测方法特异性良好。HBsAg阳性肝癌患者中可检测到cccDNA 0.003 ~ 27.110 copies/cell,与以往报道(5 ~ 50 copies/cell)基本一致<sup>[14]</sup>。在血清HBsAg和HBV DNA均阴性肝癌患者的癌组织及癌旁组织中检测到cccDNA,说明血清HBsAg和HBV DNA均阴性不能真实反映患者的HBV感染情况。有报道慢性乙肝患者经抗病毒治疗后,一些HBsAg转阴、血清HBV DNA在检测限以下或者HBeAg发生血清学转化的患者,其肝组织中仍可检测到cccDNA和HBV DNA,且以cccDNA占主要形式<sup>[14-18]</sup>,表明肝组织内cccDNA的定量检测有重要临床意义,可评价:①抗病毒药物疗效及持续应答情况;②HBV感染状态及其传染性指标<sup>[19]</sup>;③可否引发肝癌<sup>[20]</sup>;④是否肝外组织感染的客观指标<sup>[21,22]</sup>;⑤肝移植后肝脏是否再感染的指标<sup>[23,24]</sup>。

本研究采用特异性引物及探针建立了检测HBV cccDNA和tDNA的实时荧光定量PCR,用PSAD酶切增加检测cccDNA的特异性,以 $\beta$ -globin为参比,标准化每个细胞的HBV cccDNA含量,使定量更准确。本法灵敏度和特异度高,重复性好,可用于慢性乙肝患者肝活检组织HBV cccDNA和tDNA的检测,对肝组织内HBV cccDNA的监测及评估临床抗病毒疗效和预测持续应答等均有重要意义。

#### 参 考 文 献

[1] Turin F, Borel C, Benchaib M, et al. n-Butyrate, a cell cycle blocker

- inhibits early amplification of duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA after in vitro infection of duck hepatocytes. *J Virol*, 1996, 70(5):2691-2696.
- [2] Chang TT, Gish RG, de Man RA, et al. A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, 2006, 354(10):1001-1010.
- [3] Hatzakis A, Magiorkinis E, Haida C. HBV virological assessment. *J Hepatol*, 2006, 44(1 Suppl):S71-76.
- [4] Moraleda G, Saputelli J, Aldrich CE, et al. Lack of effect of antiviral therapy in nondividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus. *J Virol*, 1997, 71(12):9392-9399.
- [5] Abdelhamed AM, Kelley CM, Miller TG, et al. Rebound of hepatitis B virus replication in HepG2 cells after cessation of antiviral treatment. *J Virol*, 2002, 76(16):8148-8160.
- [6] Würsthorst K, Lutgehetmann M, Dandri M, et al. Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2006, 44(3):675-684.
- [7] Bourne EJ, Dienstag JL, Lopez VA, et al. Quantitative analysis of HBV cccDNA from clinical specimens: Correlation with clinical and virological response during antiviral therapy. *J Viral Hepat*, 2007, 14(1):55-63.
- [8] 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.
- [9] Singh M, Dicaire A, Wakil AE, et al. Quantitation of hepatitis B virus (HBV) covalently closed circular DNA (cccDNA) in the liver of HBV infected patients by LightCycler real-time PCR. *J Virol Methods*, 2004, 118(2):159-167.
- [10] Wong DK, Yuen MF, Yuan H, et al. Quantitation of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients. *Hepatology*, 2004, 40(3):727-737.
- [11] 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. *J Antiviral Ther*, 2006, 11(7):909-916.
- [12] Jun-Bin S, Zhi C, Wei-Qin N, et al. A quantitative method to detect HBV cccDNA by chimeric primer and real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, 2003, 112(1-2):45-52.
- [13] Addison WR, Walters KA, Wong WWS, et al. Half-life of the duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA pool in vivo following inhibition of viral replication. *J Virol*, 2002, 76(12):6356-6363.
- [14] Fong TL, Di Bisceglie AM, Gerber MA, et al. Persistence of hepatitis B virus DNA in the liver after loss of HBsAg in chronic hepatitis B. *Hepatology*, 1993, 18(6):1313-1318.
- [15] Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, et al. Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection. *Gastroenterology*, 2004, 126(1):102-110.
- [16] Yuen MF, Wong DK, Sablon E, et al. HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B in the Chinese: virological, histological, and clinical aspects. *Hepatology*, 2004, 39(6):1694-1701.
- [17] Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology*, 2004, 126(7):1750-1758.
- [18] Yuen MF, Wong DK, Fung J, et al. HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B in Asian patients: replicative level and risk of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2008, 135(4):1192-1199.
- [19] Chen Y, Sze J, He ML. HBV cccDNA in patients' sera as an indicator for HBV reactivation and an early signal of liver damage. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(1):82-85.
- [20] Wong DK, Yuen MF, Poon RT, et al. Quantification of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in patient in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2006, 45(4):553-559.
- [21] Lu L, Zhang YH, Yueng YH, et al. Intracellular levels of hepatitis B virus DNA and pregenomic RNA in peripheral blood mononuclear cells of chronically infected patients. *J Viral Hepat*, 2009, 16(2):104-112.
- [22] 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 Med Virol*, 2009, 81(6):988-995.
- [23] Faria LC, Gigou M, Roque-Afonso AM, et al. Hepatocellular carcinoma is associated with an increased risk of hepatitis B virus recurrence after liver transplantation. *Gastroenterology*, 2008, 134(7):1890-1899.
- [24] Lenci I, Marcuccilli F, Tisone G, et al. Total and covalently closed circular DNA detection in liver tissue of long-term survivors transplanted for HBV-related cirrhosis. *Digest Liver Dis*, 2010, 42(8):578-584.

(收稿日期:2010-12-15)

(本文编辑:张林东)