

# 人卵巢组织中 HBV DNA 和 HBV cccDNA 的表达与 HBV 宫内感染的相关性研究

余敏敏 顾小军 夏茵 王根菊 阚乃颖 吴凯华

**【摘要】 目的** 研究人卵巢组织中乙型肝炎病毒(HBV)DNA、HBV 共价闭合脱氧核糖核酸(cccDNA)表达与 HBV 宫内感染的相关性。**方法** 采用荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测 33 例 HBV DNA 阳性孕妇卵巢组织中的 HBV DNA 和 HBV cccDNA。采用化学发光法检测相应 33 例婴儿出生当日和 1 月龄外周血清乙型肝炎病毒标志物(HBVM), FQ-PCR 法检测婴儿血清 HBV DNA 含量。**结果** 33 例卵巢组织中 HBV DNA 和 HBV cccDNA 总阳性率为 51.52% (17/33)。婴儿宫内感染率为 12.12% (4/33, 4 例均为肝功能正常的孕妇)。婴儿母亲卵巢组织中 HBV DNA 和 HBV cccDNA 均阳性时, 宫内感染率比 HBV DNA、HBV cccDNA 均阴性时显著升高( $P < 0.05$ )。宫内感染婴儿较非宫内感染婴儿母亲卵巢组织中 HBV cccDNA 的表达水平和阳性率明显升高( $P < 0.01$  和  $P < 0.05$ )。**结论** HBV 可感染人卵巢组织并在其中复制, 且有可能通过卵细胞垂直传播至子代。

**【关键词】** 乙型肝炎病毒; 宫内感染; 卵巢

**Relationship between the expression of HBV DNA, HBV cccDNA in human ovary tissues and the HBV intrauterine infection** YU Min-min, GU Xiao-jun, XIA Yin, WANG Gen-ju, KAN Nai-ying, WU Kai-hua. The Second Affiliated Hospital of Southeast University, Nanjing 210003, China  
Corresponding author: YU Min-min, Email: yuminmin324@126.com

This work was supported by a grant from the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2008070).

**【Abstract】 Objective** To investigate the relationship between hepatitis B virus (HBV) deoxyribonucleic acid (DNA) and HBV covalently closed circular DNA (cccDNA) in the ovary and HBV intrauterine infection. **Methods** HBV DNA and HBV cccDNA were assayed in the ovaries of 33 pregnant women who were positive for HBV DNA, tested by Fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR). The level of HBV mark (HBVM) and the content of HBV DNA in peripheral blood of infants were measured by chemoluminescence and FQ-PCR methods respectively. **Results** The overall positive rate for both HBV DNA and HBV cccDNA in ovarian samples was 51.52% (17/33). The rate on intrauterine infection among infants was 12.12% (4/33) and all the 4 infected infants were delivered from mothers with normal hepatic function. When HBV DNA and HBV cccDNA were both positive, the rate of intrauterine infection in infants was significantly higher than those who were with both negative results ( $P < 0.05$ ). Levels of HBV cccDNA and the rate of positive samples were significantly higher in mothers with infants who appeared to have had intrauterine infection than those did not ( $P < 0.01$  and  $< 0.05$ , respectively). **Conclusion** HBV infection could be discovered in the human ovary and might be transmitted to the filial generation via ovum.

**【Key words】** Hepatitis B virus; Intrauterine infection; Ovary

乙型肝炎(乙肝)病毒(HBV)母婴垂直传播的方式包括宫内、产时及产后感染<sup>[1]</sup>。其中宫内感染的确切机制尚不清楚,可能的传播途径有血源性感染即通过胎盘传播;细胞源性感染即通过外周血单

个核细胞传播<sup>[2]</sup>;种系传播或遗传传递,即 HBV 经卵子、精子、受精卵传播。母婴 HBV 垂直传递是指受到 HBV 感染的卵细胞,与正常精子受精,使子代获得 HBV DNA 成为 HBV 携带者或者发病,这是一种尚有争议和机制未明的传播方式。由于获得卵细胞较为困难,对 HBV 感染卵细胞的研究还很少。目前研究发现,慢性乙肝妇女卵巢组织中有 HBsAg、HBeAg 和 DNA 的存在<sup>[3-5]</sup>。本研究通过检测 HBV

DNA 阳性孕妇卵巢组织中 HBV DNA 和 HBV 共价闭合脱氧核糖核酸(cccDNA), 探讨 HBV 在卵巢组织中持续存在和复制且通过卵细胞传递至子代的可能性。

### 对象与方法

1. 研究对象: 来自 2008 年 1 月至 2010 年 1 月在东南大学附属第二医院产科接受剖宫产手术的单胎孕妇及其婴儿共 33 对, 孕妇年龄 21 ~ 39 岁, 产前检查 HBsAg、HBeAg 均阳性, HBV DNA 定量  $> 1.0 \times 10^6$  copies/ml, 术中探查发现卵巢囊性、实性或囊实性肿块考虑为卵巢良/恶性肿瘤需要切除病灶或卵巢。其配偶 HBsAg、HBeAg 均阴性, HBV DNA 定量  $< 5.0 \times 10^2$  copies/ml。所有婴儿均予人工喂养。剔除标准: 有先兆流产及先兆早产史; 术前 B 超提示胎盘位置异常或胎盘早剥; 孕妇血清丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、艾滋病病毒、巨细胞病毒、EB (Epstein-Barr) 病毒阳性; 胎儿宫内窘迫史; 6 个月内使用过抗病毒药物或其他影响免疫功能的药物。患者及家属签订知情同意书, 研究方案经东南大学附属第二医院医学伦理委员会审核通过。

2. 研究方法: 33 份离体卵巢组织一部分立即予以福尔马林固定后送常规病理检查, 另一部分快速置  $-70$  °C 冰箱保存, 标本由专人统一检测。采用 FQ-PCR 法检测 HBV DNA、HBV cccDNA。核酸扩增检测试剂盒购自北京索奥生物医药科技有限公司, 血清 HBV DNA 核酸扩增检测试剂盒购自上海科华生物工程有限公司。试剂盒灵敏度均为  $5.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^9$  copies/ml。取检测结果对数值进行统计学分析。HBVM (HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb) 检测采用化学发光法, 试剂由美国 Abbott 公司提供。操作均严格按说明书进行。

(1) 卵巢组织 DNA 提取: 取冰冻卵巢组织, 用生理盐水洗净组织表面的血液, 再用 PBS 液反复冲洗, 末次洗液 PCR 检测 HBV DNA 阴性。取每份卵巢组织各约 50 mg, 分别置 1.5 ml 离心管中, 加入核酸提取液 B 50  $\mu$ l 充分混匀 (提取液用前需室温溶解并充分混匀), 用研磨器充分研磨后  $100$  °C 裂解 10 min,  $13\ 000$  r/min 离心 3 min。

(2) HBV DNA、HBV cccDNA 检测: 严格按说明书操作。HBV cccDNA 测定上游引物:  $5'$ -CGA CCG ACC TTG AGG CAT AC- $3'$ ; 下游引物:  $5'$ -AGA GTA ACT CCA CAG AT/AGC TCC- $3'$ ; 荧光探针: FAM- $5'$  CAC CTC TGC CTA ATC ATC

TCT TGT TC- $3'$ -TAMRA。

分别取 HBV-PCR、HBV-cPCR MIX Taq 酶系, 室温融化并振荡混匀后,  $10\ 000$  r/min 离心 10 s。分别配制 PCR、cPCR 反应液, 将处理后样品、HBV 阳性定量质控品和阴性质控品各 4  $\mu$ l 加入分装有反应液的反应管中,  $10\ 000$  r/min 离心 30 s 后上机检测。同时设 PBS 液为空白对照, 取患卵巢良恶性肿瘤、HBsAg 阴性、剖宫产孕妇的卵巢组织 5 例作阴性对照, HBsAg、HBeAg 均阳性, HBV DNA 定量  $> 1.0 \times 10^6$  copies/ml 的非孕妇的活体肝组织 (肝穿法获得) 5 例为阳性对照。

新生儿出生后、注射疫苗前抽股静脉血 4 ml 送检 HBVM 及 HBV DNA, 后立即注射重组酵母基因工程乙肝疫苗 (HBVac, 中国华北制药股份有限公司, 规格每支 10  $\mu$ g) 20  $\mu$ g 和乙肝免疫球蛋白 (HBIG, 中国四川成都蜀阳制药厂, 规格每支 200 IU) 200 IU, 15 d 后再注射 HBIG 200 IU, 1、6 月龄时再次注射 HBVac 20  $\mu$ g, 1 月龄复查 HBVM 及 HBV DNA。HBV 宫内感染诊断标准: 新生儿出生时血清 HBsAg 和 (或) HBV DNA 阳性并持续至 1 月龄。

3. 统计学分析: 用 SPSS 13.0 软件统计分析。计量资料两组间比较采用 *t* 检验, 分类资料采用  $\chi^2$  检验或四格表确切概率法。变量间的相关性分析采用 Spearman 等级相关分析。

### 结 果

1. HBV 宫内感染情况: 33 例婴儿出生时感染 6 例, 其中 4 例持续至 1 月龄, 婴儿宫内感染发生率为 12.12% (4/33)。

2. 卵巢组织中 HBV DNA 和 HBV cccDNA 表达及其与婴儿发生 HBV 宫内感染的相关性: 共获得满足条件的病变卵巢组织 33 份。其中 HBV DNA 阳性 12 份, HBV cccDNA 阳性 14 份 (图 1)。其结果表达模式有 4 种。A: HBV DNA、HBV cccDNA 同时阴性, B: HBV DNA 阳性、HBV cccDNA 阴性, C: HBV DNA 阴性、HBV cccDNA 阳性, D: HBV DNA、HBV cccDNA 同时阳性, 其不同表达模式与婴儿发生 HBV 宫内感染的相关性提示 (表 1), 卵巢组织中 HBV DNA 或 (和) HBV cccDNA 总阳性率为 51.52% (17/33)。随着两者表达类型的升级, 其宫内感染率也逐渐升高, 两者呈正相关, Spearman 分析  $r=0.431$ ,  $P=0.012$ 。但只有 D 与 A 比较的差异有统计学意义,  $\chi^2=6.061$ ,  $P=0.014$ 。HBsAg 阴性孕妇的 5 例卵巢组织 HBV DNA 和 HBV cccDNA 均未表达, HBsAg 阳

性的非孕妇女的活体肝组织5例均为阳性。

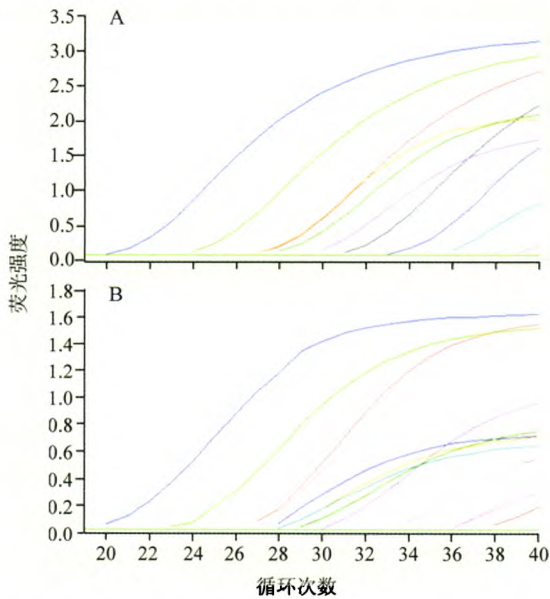


图1 部分卵巢组织标本HBV DNA(A)和HBV cccDNA(B)的扩增(FQ-PCR法)

表1 卵巢组织HBV DNA和HBV cccDNA的不同表达模式与婴儿HBV宫内感染的关系

表达模式	例数	构成比(%)	宫内感染例数	宫内感染率(%)
A	16	48.48	0	0.00
B	3	9.09	0	0.00
C	5	15.15	1	20.00
D	9	27.27	3	33.33

注： $\chi^2(A:C)=3.36, P=0.067$ ； $\chi^2(A:D)=6.061, P=0.014$ ； $\chi^2(B:C)=0.686, P=0.408$ ； $\chi^2(B:D)=1.333, P=0.248$ ； $\chi^2(C:D)=0.280, P=0.597$

3. 宫内感染与卵巢组织中HBV DNA和HBV cccDNA的表达水平和阳性率比较：宫内感染婴儿较非宫内感染婴儿母亲卵巢组织中HBV cccDNA的表达水平和阳性率均明显升高，但HBV DNA的表达水平和阳性率的差异无统计学意义( $P>0.05$ )，而HBV cccDNA的表达水平和阳性率的差异均有统计学意义( $P<0.01$ 和 $P<0.05$ )，见表2。

表2 婴儿宫内感染与卵巢组织中HBV DNA和HBV cccDNA的表达水平及阳性率的关系

婴儿组别	卵巢HBV DNA水平 (copies/ml)	阳性率 (%)	卵巢HBV cccDNA水平 (copies/ml)	阳性率 (%)
宫内感染	2.88±1.94	75.00(3/4)	4.06±1.01	100.00(4/4)
非宫内感染	1.18±1.85	31.03(9/29)	1.13±1.60	33.33(10/29)

注：两组卵巢HBV DNA水平比较， $t=1.707, P=0.098$ ；阳性率比较， $\chi^2=2.936, P=0.087$ ；HBV cccDNA水平比较， $t=5.018, P=0.003$ ；阳性率比较， $\chi^2=6.177, P=0.013$

4. 孕妇血清HBV DNA水平与卵巢组织HBV DNA、HBV cccDNA表达水平的比较：33例孕妇血清HBV DNA平均对数值为(7.74±0.56)copies/ml，

卵巢组织中HBV DNA、HBV cccDNA平均对数值分别为(1.39±1.91)copies/ml和(1.48±1.81)copies/ml，两者差异无统计学意义( $t=-0.207, P=0.837$ )，但均显著低于血清HBV DNA水平( $t=18.324, 18.996, P=0.000$ )。

5. 孕妇不同血清HBV DNA水平与卵巢组织HBV DNA、HBV cccDNA阳性率、宫内感染率比较：孕妇血清HBV DNA水平 $>1.0 \times 10^8$ copies/ml时，卵巢组织HBV DNA、HBV cccDNA表达概率、宫内感染率明显增加，但与 $<1.0 \times 10^8$ copies/ml组比较，差异无统计学意义( $P>0.05$ )。孕妇血清HBV DNA水平与宫内感染率之间呈正相关，Spearman分析 $r=0.894, P=0.000$ 。见表3。

表3 孕妇不同血清HBV DNA水平与卵巢组织HBV DNA、HBV cccDNA阳性率、宫内感染率的比较

血清HBV DNA水平 ( $\times 10^8$ copies/ml)	卵巢组织		宫内感染率 (%)
	HBV DNA 阳性率(%)	HBV cccDNA 阳性率(%)	
$<1.0$	26.09(6/23)	39.13(9/23)	8.70(2/23)
$\geq 1.0$	60.00(6/10)	50.00(5/10)	20.00(2/10)

注：两组卵巢组织HBV DNA阳性率比较， $\chi^2=3.464, P=0.063$ ；HBV cccDNA阳性率比较， $\chi^2=0.337, P=0.561$ ；两组宫内感染率比较， $\chi^2=0.836, P=0.361$

6. 孕妇肝功能对HBV宫内感染的影响：33例孕妇中肝功能异常者胎儿宫内感染率为0%(0/10)，肝功能正常者胎儿宫内感染率为17.39%(4/23)， $\chi^2=1.979, P=0.216$ 。

## 讨 论

1. HBV感染卵巢的证据：近年研究发现许多肝外组织和脏器存在HBV(检测到HBV DNA或乙肝抗原)<sup>[6,7]</sup>，提示该病毒具有泛嗜性<sup>[8-10]</sup>。有学者发现HBV在肝外侵犯的主要器官是肾脏，卵巢属于生殖系统，与泌尿系统均起源于体壁中胚层，根据HBV的生物学特性和卵巢组织的生理特征，认为HBV感染卵巢组织进而可能感染生殖细胞<sup>[9]</sup>。目前已有多项研究在慢性乙肝妇女的卵巢组织或卵泡细胞中检测出HBsAg、HBeAg和HBV DNA<sup>[3-5,11]</sup>。提示HBV可以感染卵巢或卵细胞。本研究检测33例孕妇卵巢组织中HBV DNA和HBV cccDNA，结果12例HBV DNA阳性，14例HBV cccDNA阳性，两者表达水平的差异无统计学意义，但均较血清HBV DNA的水平明显降低，推测其原因可能是大量病毒在肝细胞内复制后首先释放入血，后继经血循环感染卵巢，因卵巢不是HBV特异的靶器官，故感染机会及病毒数量减少，提示卵巢感染HBV与病毒复制不呈

平行关系,血清 HBV DNA 不是评价 HBV 经卵细胞垂直传播的有效指标。推测卵巢除经血液途径感染 HBV 外,可能还存在其他感染途径和机制。HBV cccDNA 是 HBV 的原始复制模板。Chen 等<sup>[12]</sup>认为,血清中 cccDNA 是由肝细胞损伤后释放至血液中,与血清 HBV DNA 相比,HBV cccDNA 能更精确地反映病毒存在及复制状态。因此,卵巢组织中检测到 HBV cccDNA,不仅说明卵巢组织被感染,而且提示 HBV 在其中装配和复制。本研究为 HBV 在卵巢组织的感染和复制提供新的证据。

2. 卵巢组织中 HBV cccDNA 在 HBV 宫内感染中的作用:目前少有 HBV 在卵巢组织表达的研究报道,且研究对象主要是乙肝非孕妇的卵巢组织,故仅证实卵巢可能被 HBV 感染,无法证实 HBV 是否能够通过卵细胞传递至子代。关于 HBV 在孕妇卵巢组织表达的报道罕见,Lou 等<sup>[11]</sup>通过检测 68 例 HBsAg 阳性孕妇卵巢组织中的 HBsAg 表达,发现卵巢组织 HBV 感染与宫内感染无明显的相关性。HBsAg 是 HBV 的外膜蛋白,常作为免疫组化检测的 HBV 标志蛋白,但表达较少,且免疫组化检测方法不够敏感,不能定量,易出现假阴性。而 PCR 方法敏感性高,可以检测微量的 HBV DNA 和 HBV cccDNA,但无法定位,因卵巢间质血管丰富,组织中含有血液,故特异性差,有一定假阳性率。本研究采用生理盐水、PBS 液反复冲洗,直至末次洗液 PCR 检测 HBV DNA 阴性以减少假阳性。

由于 HBV 具有很强的嗜肝细胞特性,卵细胞并不是其特异的靶细胞,目前的研究发现卵巢组织有 HBV DNA 的存在,只能说明 HBV 能感染卵巢组织,但是否在其内复制循环尚未可知。cccDNA 是 HBV 原始复制模板,代表着具有感染、复制和装配的能力,对 HBV 的复制及感染状态的建立具有十分重要的意义<sup>[13-16]</sup>。目前,HBV cccDNA 的检测方法日趋成熟<sup>[17-22]</sup>。Sung 等<sup>[23]</sup>检测 47 例接受拉米夫定治疗的慢性乙肝患者肝组织 cccDNA,认为可作为预测持续性病毒应答指标,其准确性优于血清 HBV DNA 检测,更能反映病毒活跃复制的状态。本研究采用荧光 PCR 定量法检测乙肝孕妇卵巢组织中 HBV DNA 和 HBV cccDNA 的表达,并与婴儿宫内感染情况做比较。结果两者的表达与婴儿发生 HBV 宫内感染之间呈正相关,卵巢组织中同时检测到 HBV DNA 和 HBV cccDNA 与两者均阴性比较,婴儿发生宫内感染的危险性增加( $P < 0.05$ )。HBV cccDNA 阳性者宫内感染率要高于 HBV DNA 阳性

者,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

本研究还观察到,宫内感染婴儿与非宫内感染婴儿其母亲卵巢组织中 HBV cccDNA 的表达水平和阳性率的差异均有统计学意义( $P < 0.01$  和  $P < 0.05$ )。提示宫内感染与卵巢组织中 HBV cccDNA 的表达密切相关。推测 HBV cccDNA 在卵巢组织感染 HBV 的过程中起关键作用,不仅是 HBV 感染卵巢及其复制的敏感指标,也是预测垂直遗传的重要依据。另外还观察到,当血清 HBV DNA  $> 10^8$  copies/ml 时,宫内感染率增加,但与  $< 1.0 \times 10^8$  copies/ml 组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),可能与本研究例数较少有关。孕妇血清 HBV DNA 水平与宫内感染率之间呈正相关,提示母亲血清 HBV DNA 水平是婴儿宫内感染的相对独立危险因素,经血液途径感染仍是母婴传播的主要途径<sup>[11]</sup>。值得注意的是,10 例肝功能异常孕妇的胎儿未发生宫内感染,而肝功能正常孕妇的胎儿宫内感染率为 17.39%,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。提示肝功能异常孕妇虽然处于免疫清除期,但如不伴随 HBV DNA 的下降,则对宫内感染率无明显影响。

本研究例数偏少,且检测的是卵巢组织而非卵细胞中的 HBV cccDNA,检测方法也存在一定不足,故不能完全肯定卵巢组织中 HBV cccDNA 在 HBV 垂直遗传中的作用,但至少说明卵巢组织中如存在 HBV cccDNA,则卵子感染 HBV 的可能性增加,遗传风险也将增加。说明 HBV 经卵巢-卵细胞-子代的母婴传播途径在其母婴传播中仍占据一定地位。

#### 参 考 文 献

- [1] Zhou YH, Wu C, Zhuang H. Vaccination against hepatitis B: the Chinese experience. *Chin Med J*, 2008, 121(1): 98-102.
- [2] Gatta A, Giannini C, Lampertico P, et al. Hepatotropic virus: new insights in pathogenesis and treatment. *Clin Exp Rheumatol*, 2008, 26(1 Suppl 48): S33-38.
- [3] Ye F, Yue YF, Li SH, et al. Presence of HBsAg, HBcAg, and HBV DNA in ovary and ovum of the patients with chronic hepatitis B virus infection. *Am J Obst Gynecol*, 2006, 194(2): 387-392.
- [4] Ye F, Yue YF, Li SH, et al. Expression of HBsAg and HBcAg in the ovaries and ova of patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(36): 5718-5720.
- [5] Chen LZ, Fan XG, Gao JM. Detection of HBsAg, HBcAg, and HBV DNA in ovarian tissues from patients with HBV infection. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(35): 5565-5567.
- [6] Yang CY, Su XS. Distribution of HBV antigens in extrahepatic organs. *Chin J Hepatol*, 2000, 8(2): 124-128. (in Chinese)  
杨春艳,苏先狮.乙型肝炎病毒抗原在肝外主要脏器中的分布.

- 中华肝病杂志, 2000, 8(2): 124-128.
- [7] Lin CY. Hepatitis B virus deoxyribonucleic acid in kidney cells probably leading to viral pathogenesis among hepatitis B virus associated membranous nephropathy patients. *Nephron*, 1993, 63(1): 58-64.
- [8] Han SH. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis B. *Clin Liver Dis*, 2004, 8(2): 403-418.
- [9] Amarapurkar DN, Amarapurkar AD. Extrahepatic manifestations of viral hepatitis. *Ann Hepatol*, 2002, 1(4): 192-195.
- [10] Ursell PC, Habib A, Sharma P. Hepatitis B virus and myocarditis. *Hum Pathol*, 1984, 15(5): 481-484.
- [11] Lou H, Ding W, Dong M, et al. The presence of hepatitis B surface in the ova of pregnant women and it's relationship with inter-uterine infection by hepatitis B virus. *J Int Med Res*, 2010, 38: 214-219.
- [12] Chen Y, Sze J, He ML. HBV cccDNA in patients sera an indicator for HBV reactivation and an early signal of liver damage. *J World Gastroenterol*, 2004, 10(1): 82-85.
- [13] Funk A, Mhamdi M, Will H, et al. Avian hepatitis B viruses: molecular and cellular biology, phylogenesis, and host tropism. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(1): 91-103.
- [14] Parvez MK, Sehla D, Sarin SK, et al. Inhibition of hepatitis B viruses DNA replication intermediate forms by recombinant interferon-gamma. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(19): 3006-3014.
- [15] Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(1): 48-64.
- [16] Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection: natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*, 2004, 350: 1118-1129.
- [17] Addison WR, Wong WW, Fischer KP, et al. A quantitative competitive PCR assay for the covalently closed circular form of the duck hepatitis B virus. *Antiviral Res*, 2000, 48(1): 27-37.
- [18] He ML, Wu J, Chen Y, et al. A new and sensitive method for the quantification of HBV cccDNA by real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 295(5): 1102-1107.
- [19] 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 light cycler real-time PCR. *J Virol Method*, 2004, 118(2): 159-167.
- [20] Takkenberg RB, Zaaijer HL, Menting S, et al. Detection of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in paraffin-embedded and cryo-preserved liver biopsies of chronic hepatitis B patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 22(8): 952-960.
- [21] 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. *Dig Liver Dis*, 2010, 42: 578-584.
- [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: 988-995.
- [23] 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.

(收稿日期: 2012-08-21)

(本文编辑: 张林东)

## 读者·作者·编者

### 中华医学会系列杂志已标注数字对象惟一标识符

数字对象惟一标识符(digital object identifier, DOI)是对包括互联网信息在内的数字信息进行标识的一种工具。

为了实现中华医学会系列杂志内容资源的有效数字化传播,同时保护这些数字资源在网络链接中的知识产权和网络传播权,为标识对象的版权状态提供基础,实现对数字对象版权状态的持续追踪,自2009年第1期开始,中华医学会系列杂志纸版期刊和数字化期刊的论文将全部标注DOI。即中华医学会系列杂志除科普和消息类稿件外,其他文章均需标注DOI,DOI标注于每篇文章首页脚注的第1项。由中华医学会杂志社各期刊编辑部为决定刊载的论文标注DOI。

参照IDF编码方案(美国标准ANSI/NISO Z39.84-2000)规定,中华医学会系列杂志标注规则如下:“DOI:统一前缀/学会标识.信息资源类型.杂志ISSN.\*\*\*\*-\*\*\*\*.年期.论文流水号”。即:“DOI:10.3760/cma.j.issn.\*\*\*\*-\*\*\*\*.yyyy.nn.zzz”。

中华医学会系列杂志标注DOI各字段释义:“10.3760”为中文DOI管理机构分配给中华医学会系列杂志的统一前缀;“cma”为中华医学会(Chinese Medical Association)缩写;“j”为journal缩写,代表信息资源类别为期刊;“issn.\*\*\*\*-\*\*\*\*”为国际标准连续出版物号(ISSN);“yyyy”为4位出版年份;“nn”为2位期号;“zzz”为3位本期论文流水号。

中华医学会杂志社