

• 论 著 •

HBsAg 转阴前后慢性乙肝患者 HBV cccDNA 荧光定量检测的意义

王志剑¹, 郭振华²

(1. 河源市源城区人民医院检验科, 广东河源 517000; 2. 兰州大学第一医院检验科, 甘肃兰州 730000)

摘要:目的 探讨慢性乙型肝炎患者乙型肝炎病毒(HBV)cccDNA 检测的意义。方法 检测乙型肝炎患者乙肝 e 抗原(HBsAg)转阴前后肝组织 HBV 共价闭合环状 DNA(cccDNA)、血清 HBV DNA。用实时荧光定量 PCR 方法检测 HBV DNA、cccDNA 水平,通过质粒保护型的 DNA 酶对提取的 DNA 模板进行酶切处理,再分别进行 HBV DNA 和 cccDNA 的定量检测。结果 HBsAg 转阴前,慢性乙肝患者总 HBV DNA 水平和 cccDNA 水平呈正相关($r=0.911, P<0.01$);而 HBsAg 转阴后,血清 HBV DNA 水平和肝组织 cccDNA 水平的检测不一致。结论 HBV cccDNA 可作为反映慢性乙肝患者抗病毒治疗预后的指标。

关键词:慢性乙肝; 共价闭合环状 DNA; 乙肝 e 抗原

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.06.038 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2015)06-0806-03

Significance of fluorescence quantitative detection of HBV cccDNA in patients with chronic hepatitis B before and after HBsAg seroconversion

Wang Zhijian¹, Guo Zhenhua²

(1. Department of Clinical Laboratory, Yuancheng District People's Hospital, Heyuan, Guangdong 517000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated First Hospital, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract:Objective To explore the significance of anti-viral marker cccDNA detection in the patients with chronic hepatitis B. Methods Serum hepatitis B virus(HBV) DNA and covalently closed circular DNA(cccDNA) in liver tissue were detected before and after HBsAg seroconversion in the patients with hepatitis B by the real time fluorescent PCR method. The extracted DNA templates were digested by the protective plasmid DNA enzyme. Then HBV DNA and cccDNA were detected. Results The total HBV DNA level was positively correlated with the cccDNA level before HBsAg negative conversion in the patients with chronic hepatitis B, the detection of serum HBV DNA level and liver tissue cccDNA level was inconsistent. Conclusion HBV cccDNA may serve as a prognostic indicator reflecting the antiretroviral therapy in the patients with chronic hepatitis B.

Key words:cirrhosis; covalently closed circular DNA; HBsAg

乙型肝炎病毒(HBV)感染是一个全球性的公共健康问题,有超过 3.5 亿人感染,我国慢性乙型肝炎患者超过 2 000 万人。乙型肝炎(简称乙肝)感染者可表现为无症状携带者、慢性乙肝、肝硬化和肝癌^[1-2]。HBV 共价闭合环状 DNA(cccDNA)是 HBV 基因组复制中间体 mRNA 和前基因组 RNA 的合成模板,是 HBV 持续感染的主要因素^[3-6]。最近研究表明,HBV cccDNA 也是抗病毒治疗结束后病毒反弹的主要原因^[3-4]。本研究以慢性乙肝患者乙肝 e 抗原(HBsAg)转阴前后 HBV DNA 水平检测为基础,探讨了慢性乙肝患者 HBV cccDNA 检测的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 在患者知情和通过医院伦理委员会审查的前提下,笔者于 2010~2012 年,分 2 次收集了兰州大学第一医院 16 例慢性乙肝患者 HBsAg 转阴前后的肝脏穿刺组织标本和血清标本共 64 份(每位患者采集 4 份标本)。上述患者中男 12 例,女 4 例,年龄 2~58 岁,平均(34.5±8)岁。

1.2 仪器与试剂 检测使用上海宏石公司的 SLAN 实时荧光定量 PCR 检测系统,HBV DNA 定量试剂盒和 HBV cccDNA 定量试剂盒均购自上海星耀医学科技发展有限公司。乙肝质粒保护型 DNA 酶(Plasmid-Safe™ ATP-Dependent

DNase)为美国 Epicentre 公司产品。DNA 提取试剂盒(Qiamp DNA Mini)为德国 QIAGEN 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 HBV DNA 的提取 用试剂盒提取所有肝组织样本和血清标本的 DNA。肝组织样本质量不少于 15 mg,提取 DNA 前肝组织称重并记录。提取方法参照试剂盒说明书。肝组织细胞数目通过试剂盒内参基因进行估测,中值确定为 1×10^6 cells/mg。

1.3.2 DNA 酶消化处理 为消除非 cccDNA 的影响,选用质粒保护型 DNA 酶进行预处理。酶反应体系为 50 μ L,2 μ L 25 mmol/L ATP、5 μ L 缓冲液、1 μ L 酶,再加入 1.2.1 中提取好的血清 HBV DNA 25 μ L,最后用蒸馏水补足至 50 μ L。将反应体系置于 37 $^{\circ}$ C 保温箱中温育 30 min,温育结束后 70 $^{\circ}$ C 灭活 30 min。

1.3.3 荧光定量 PCR 检测 对得到的 DNA 模板,用 HBV DNA 定量试剂盒和 HBV cccDNA 定量试剂盒进行 HBV DNA 和 HBV cccDNA 的定量检测。检测在 SLAN 实时荧光定量 PCR 检测系统上进行,扩增程序为 50 $^{\circ}$ C 2 min,94 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 10 s、60 $^{\circ}$ C 35 s,共 40 个循环;在 60 $^{\circ}$ C 采集荧光信号。

作者简介:王志剑,男,副主任检验技师,主要从事分子生物学检测诊断的研究。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计学处理,使用 Pearson 相关性分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者 HBeAg 阳性时 HBV DNA 的检测 血清 HBV DNA 浓度范围为 $6.74\times10^8\sim4.79\times10^6$ copies/mL。cccDNA 浓度范围为 $1.35\times10^7\sim4.49\times10^4$ copies/mL。cccDNA 占总 HBV DNA 的比例为 0.4%~27.0%。见表 1。

表 1 患者 HBeAg 阳性时 HBV cccDNA 和 DNA 水平的检测

| 标本编号 | HBV DNA (对数值) | HBVcccDNA (对数值) | cccDNA 所占比例(%) |
|------|------------------|--------------------|-------------------|
| 1 | 7.83 | 5.88 | 1.05 |
| 2 | 7.54 | 5.98 | 2.72 |
| 3 | 8.82 | 7.15 | 18.43 |
| 4 | 8.18 | 5.88 | 4.87 |
| 5 | 7.68 | 6.18 | 3.00 |
| 6 | 7.54 | 6.51 | 9.20 |
| 7 | 7.52 | 6.98 | 28.00 |
| 8 | 7.94 | 6.80 | 7.20 |
| 9 | 7.98 | 6.38 | 2.50 |
| 10 | 7.62 | 5.00 | 2.40 |
| 11 | 6.88 | 5.46 | 3.80 |
| 12 | 7.04 | 5.34 | 1.90 |
| 13 | 6.96 | 4.65 | 0.40 |
| 14 | 7.49 | 6.60 | 12.90 |
| 15 | 7.28 | 5.95 | 4.60 |
| 16 | 6.68 | 6.11 | 27.00 |

2.2 患者 HBeAg 阳性时肝组织 cccDNA 与血清 HBV DNA 水平的相关性 慢性乙肝患者肝组织 cccDNA 水平与血清 HBV DNA 水平呈正相关($r=0.911$, $P<0.01$),见图 1。

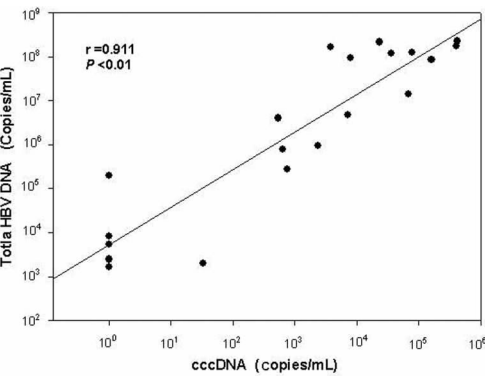


图 1 cccDNA 和血清 HBV DNA 的相关性

2.3 患者 HBeAg 转阴后肝组织和血清 HBV DNA 的检测 血清 HBV DNA 有 6 例大于 10^3 copies/mL;肝组织 HBV cccDNA 有 15 例大于 10^3 拷贝/ 10^6 个细胞。血清 HBV DNA 的最高水平为 2.51×10^4 copies/mL;肝组织 HBV cccDNA 的最水平为 3.24×10^6 拷贝/ 10^6 个细胞。见表 2。

表 2 HBeAg 阴性患者检测指标

| 样本编号 | 血清 HBV DNA (copies/mL) | 肝组织 HBV cccDNA (拷贝/ 10^6 个细胞) |
|------|---------------------------|------------------------------------|
| 1 | 1.50×10^3 | 2.64×10^4 |
| 2 | $<1\ 000$ | 8.81×10^3 |
| 3 | 1.51×10^3 | 3.67×10^5 |
| 4 | $<1\ 000$ | 7.50×10^5 |
| 5 | $<1\ 000$ | 1.50×10^4 |
| 6 | 2.51×10^4 | 3.24×10^6 |
| 7 | 5.31×10^3 | 4.79×10^5 |
| 8 | 2.64×10^3 | 6.48×10^5 |
| 9 | $<1\ 000$ | 3.65×10^4 |
| 10 | $<1\ 000$ | 1.05×10^3 |
| 11 | $<1\ 000$ | 2.87×10^3 |
| 12 | $<1\ 000$ | 5.22×10^3 |
| 13 | $<1\ 000$ | $<1\ 000$ |
| 14 | 1.48×10^3 | 5.68×10^4 |
| 15 | $<1\ 000$ | 2.77×10^3 |
| 16 | $<1\ 000$ | 9.67×10^4 |

3 讨 论

本研究表明,HBeAg 阳性慢乙肝患者的 cccDNA 水平要显著高于 HBeAg 阴性慢乙肝患者,并且与肝内总 HBV DNA、血清中 HBV DNA 呈高度正相关。在所有 HBeAg 阴性患者肝组织中大部分能检测到 cccDNA,这可能解释了为何 HBeAg 阴性患者病情仍有可能出现反复。事实上,HBV 的复制和肝炎进展是反复波动的,即使 HBsAg 清除的患者,在肝组织内仍可能检测到少量的 cccDNA。16 例转阴的患者中,只有 6 例血清 HBV DNA 为阳性,而肝组织 cccDNA 却有 15 例呈阳性,因此血清 HBV DNA 阴性和 HBeAg 阴性的患者乙肝病毒并没有被清除掉,这给患者病毒反弹导致复发带来了很大的风险。

ccc DNA 是乙肝病毒持续感染的重要因素,也是 HBV 复制最关键的指标之一,其准确性超过目前常用的乙肝 DNA 检测[7-8]。因此,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治疗和决定治疗终点的一个指标[9-12]。

研究表明,肝组织 cccDNA 的定量检测结果可以用作抗病毒药物的疗效评价新指标,cccDNA 的清除情况也可以帮助进行患者预后判断,预测病毒反弹风险,对临床有针对性地进行抗病毒治疗有重要意义。

参考文献

[1] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. 中华肝脏病杂志,2011,19(1):13-24.

[2] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中华传染病杂志,2005,23(6):421-431.

[3] 李明,王金山. 慢性乙肝血清标志物分析[J]. 吉林医学,2010,3(27):4766.

(下转第 810 页)

续表 1 20 台血糖仪评价结果[%(n/n)]

| 血糖仪 | 卫生部 2011 年 1 月 10 号《规范》 | | | ISO15197:2013(电子版) | | |
|---------------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------|--------------------|---------------------------------|-------------------------|
| | 总符合率 (%) | 血糖浓度<4.2 mmol/L ±0.83 mmol/L | 血糖浓度≥4.2 mmol/L ±20% | 总符合率 (%) | 血糖浓度<5.5 mmol/L ±0.83 mmol/L | 血糖浓度≥5.5 mmol/L ±15% |
| SanNuo | 87 | 100(18/18) | 84(69/82) | 69 | 92(24/26) | 61(45/74) |
| YiCheng 5D-2 | 82 | 89(16/18) | 80(66/82) | 70 | 73(19/26) | 69(51/74) |
| YiCheng JPS-7 | 73 | 72(13/18) | 73(60/82) | 59 | 58(15/26) | 59(44/74) |
| YuYue | 69 | 72(13/18) | 68(56/82) | 55 | 62(16/26) | 53(39/74) |

* 同型号的两台仪器,使用不同批号的试纸。

3 讨 论

本次研究招募了 42 台家用血糖仪,最终挑选出 10 个品牌的 20 台血糖仪进行实验,其中进口仪器 13 台 6 个品牌,国产仪器 7 台 4 个品牌。20 台血糖仪均没有达到 ISO15197:2013 版的标准要求,11 台(55%)达到国家标准,均为进口血糖仪。如果不讨论国产仪器,13 台进口仪器中的 11 台(84.6%)既符合国家标准,也符合 ISO1597:2003 版标准,与国外报道 59% 的血糖仪达标率有较大差异^[3-4]。

ISO 定义的最低准确度要求是针对于全部临床检测范围,然而血糖仪的准确度并不能在整个检测范围表现优秀,而是在不同的区间(如低值、中值、高值范围)有不同的表现。

根据 ISO 标准,<2.8 mmol/L 的标本可以通过孵育获得,>22.2 mmol/L 的标本可以通过添加葡萄糖得到,但是氧消耗不同的影响使得这些被修饰过的标本中的氧含量不同,导致血糖仪的检测结果比真值要低^[5-6]。

本研究采用的样本是手指毛细血管血和静脉血,分别用于血糖仪和生化分析仪,所得结果与国内报道较高符合率的结果差异较大,国内研究均采用静脉血做比对试验^[7-8]。

家用血糖仪虽然给糖尿病患者监测血糖带来方便,但是在治疗上可能带来隐患。由于血糖仪性能的稳定性和准确性不太理想,血糖仪检测结果普遍低于实验室的检测结果约 15%,当家用血糖仪检测结果在临界值附近时,其真值可能已经超出正常范围了。在血糖仪的选择上尽量使用大品牌 and 售后服务好的公司,严格按说明书操作,定期做质控或校准,能得到相对可靠的结果。

参考文献

[1] 丛玉隆. 实用检验医学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2013:1144.

[2] Polonsky WH, Fisher L, Schikman CH, et al. Structured self-monitoring of blood glucose significantly reduces A1C levels in poorly controlled, noninsulin-treated type 2 diabetes: results from the Structured Testing Program study[J]. Diabetes Care, 2011, 34(2):262-267.

[3] Freckmann G, Baumstark A, Jendrike N, et al. System accuracy evaluation of 27 blood glucose monitoring systems according to DIN EN ISO 15197[J]. Diabetes Technol Ther, 2010, 12(3):221-231.

[4] Walsh J, Roberts R, Vigersky RA, et al. New criteria for assessing the accuracy of blood glucose monitors meeting, october 28, 2011 [J]. J Diabetes Sci Technol, 2012, 6(2):466-474.

[5] Kuo CY, Hsu CT, Ho CS, et al. Accuracy and precision evaluation of seven self-monitoring blood glucose systems[J]. Diabetes Technol Ther, 2011, 13(5):596-600.

[6] Freckmann G, Schmid C, Baumstark A, et al. System accuracy evaluation of 43 blood glucose monitoring systems for self-monitoring of blood glucose according to DIN EN ISO 15197[J]. J Diabetes Sci Technol, 2012, 6(5):1060-1075.

[7] 唐立萍, 居漪, 欧元祝, 等. POCT 血糖仪的性能分析[J]. 检验医学, 2010, 25(1):13-16.

[8] 何亚妮, 李海炜, 伍惠玲, 等. 88 台 4 种型号 POCT 血糖仪检测血糖结果的探讨[J]. 广西医科大学学报, 2012, 29(1):85.

(收稿日期:2014-10-15)

(上接第 807 页)

[4] 石成. HBeAg 阳性或阴性的和慢性乙肝患者血清 HBV DNA、ALT、AST 的结果分析[J]. 实验与检验医学, 2011, 29(5):503-505.

[5] 黄启生. 慢性肝病患者血清 HBeAg 状态及 ALT 和 AFP 水平分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2011, 10(24):1933-1935.

[6] 张书楠, 余文辉, 洲大桥, 等. 慢性乙型肝炎患者乙型肝炎病毒耐药基因型研究[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 30(12):1797-1799.

[7] 何洁静, 曾兰兰, 杨永泉, 等. 慢性乙型肝炎患者拉米夫定治疗后出现 YMDD 变异的相关因素分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(13):1434-1435.

[8] Ghany M, Liang TJ. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B[J]. Gastroenterology, 2007, 132(4):1574-1585.

[9] Addison WR, Waiters KA, Wong W, et al. Half-life of the duck

hepatitis B virus covalently closed circular DNA pool in vivo following inhibition of viral replication[J]. J Virol, 2002, 76(12):6356-6363.

[10] He ML, 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.

[11] Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, et al. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B[J]. N Engl J Med, 2005, 352(26):2673-2681.

[12] Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, et al. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B for upto 5 years[J]. Gastroenterology, 2006, 131(6):1743-1751.

(收稿日期:2014-12-08)