

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.09.005

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190228.1809.007.html(2019-03-01)

## 基于磁性纳米富集 DNA 及滚环扩增技术检测 PBMC 内 HBV cccDNA 临床价值分析\*

王友强<sup>1,2</sup>, 郭永灿<sup>2</sup>, 兰由玉<sup>3</sup>, 魏聪<sup>2</sup>, 刘鹏<sup>4△</sup>

(1. 西南医科大学中西医结合学院, 四川泸州 646000; 2. 西南医科大学附属中医医院检验科, 四川泸州 646000; 3. 西南医科大学附属医院风湿免疫科, 四川泸州 646000; 4. 西南医科大学附属中医医院肝病科, 四川泸州 646000)

**[摘要]** **目的** 探讨磁性纳米富集 DNA 及滚环扩增技术(RCA)检测外周血单个核细胞(PBMC)乙型肝炎病毒(HBV)共价闭合环状 DNA(cccDNA)水平及其临床价值。**方法** 选择西南医科大学附属医院 98 例 HBV 感染者为 HBV 组,另选择该院同期健康体检者 100 例为对照组。通过磁性纳米富集技术提取,RCA 扩增、跨缺口引物介导的实时荧光定量 PCR 测定 PBMC 内 HBV cccDNA;同时检测 HBV DNA、HBsAg、HBeAg 水平,取肝脏组织活检行炎症活动度、纤维化分期程度分级,并进行相关统计学分析。**结果** 基于磁性纳米富集、RCA 的检测技术能够测定 PBMC 内 HBV cccDNA。HBV 患者 PBMC 内 HBV cccDNA 阳性率为 62.24% (61/98),伴肝衰竭、肝硬化患者 PBMC 内 HBV cccDNA 阳性率明显高于急性 HBV、慢性 HBV 感染患者( $P < 0.05$ )。 $\geq G_2/S_2$  期患者 PBMC 内 HBV cccDNA 量明显高于 $< G_2/S_2$  患者( $P = 0.001$ ),血清 HBV DNA $\geq 1 \times 10^5$  copies/mL 患者 PBMC 内 HBV cccDNA 水平明显高于 $< 1 \times 10^5$  copies/mL 患者( $P = 0.001$ )。PBMC 内 HBV cccDNA 量与血清 HBV DNA、HBsAg、HBeAg(HBeAg 阳性患者)水平呈明显正相关( $r = 0.437, 0.338, 0.521, P = 0.000, 0.001, 0.001$ )。抗病毒治疗 24 周[曲线下面积(AUC)=0.771, $P = 0.005$ ],48 周(AUC=0.868, $P = 0.000$ )时 PBMC 内 HBV cccDNA 水平可对病毒应答明显预测。**结论** 通过磁性纳米富集、RCA 技术能够检测 PBMC 内 HBV cccDNA,其水平与 HBV 疾病进展、血清感染标志物有一定关系,能够预测抗病毒治疗效果。

**[关键词]** 磁性纳米富集;滚环扩增;肝炎病毒,乙型;共价闭合环状 DNA;外周血单个核细胞

**[中图分类号]** R373.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)09-1462-05

### Clinical analysis of the detection of hepatitis B virus cccDNA in peripheral blood mononuclear cells based on magnetic nano enrichment DNA and rolling ring amplification technique\*

WANG Youqiang<sup>1,2</sup>, GUO Yongcan<sup>2</sup>, LAN Youyu<sup>3</sup>, WEI Cong<sup>2</sup>, LIU Peng<sup>4△</sup>

(1. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Clinical laboratory, the Affiliated Traditional Chinese Medical Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China. 3. Department of Rheumatology and Immunology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 4. Department of Hepatobiliary Diseases, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**[Abstract]** **Objective** To detect the level of hepatitis B virus (HBV) cccDNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by magnetic nanoparticle enrichment DNA and rolling circle amplification (RCA) and analyze its clinical value. **Methods** A total of 98 patients with HBV in the Affiliated Hospital of Southwest Medical University were selected as the subjects (group HBV), and the other 100 healthy controls were negative controls. The HBV cccDNA of PBMC were detected by magnetic nano enrichment DNA, RCA and real time fluorescence quantitative PCR by cross notched primers. The levels of HBV DNA, HBsAg and HBeAg were detected. Inflammatory activity and fibrosis stage classification were performed by liver biopsy. Data were

\* 基金项目:四川省卫生和计划生育委员会科研课题重点项目(16ZD0036);西南医科大学-西南医科大学附属中医院联合专项项目(2016-001203001)。作者简介:王友强(1983-),主管技师,在读硕士研究生,主要从事临床基础检验和免疫检验研究。△ 通信作者,E-mail: 531858298@qq.com。

statistical analyzed. **Results** The methods based on magnetic nano enrichment and RCA detection technology can determine the HBV cccDNA in PBMC. The positive rate of HBV cccDNA in PBMC was 62.24% (61/98) in HBV patients. The positive rate of HBV cccDNA in PBMC with liver failure and liver cirrhosis were significantly higher than that in acute HBV and chronic HBV patients ( $P < 0.05$ ). The HBV cccDNA in PBMC of patients with  $\geq G_2/S_2$  stage significantly higher than patients with  $< G_2/S_2$  stage ( $P = 0.001$ ), the HBV cccDNA in PBMC of patients with HBV DNA  $\geq 1 \times 10^5$  copies/mL was significantly higher than patients with  $< 1 \times 10^5$  copies/mL ( $P = 0.001$ ). The level of HBV cccDNA in PBMC was positively correlated with serum HBV DNA, HBsAg and HBeAg (HBeAg positive patients) levels ( $r = 0.437, P = 0.000; r = 0.338, P = 0.001; r = 0.521, P = 0.001$ ). At the 24th week (AUC = 0.771,  $P = 0.005$ ) and 48th week (AUC = 0.868,  $P = 0.000$ ) after antiviral treatment, the HBV cccDNA level in PBMC could obviously predict the viral response. **Conclusion**

The HBV cccDNA in PBMC can be detected by magnetic nano enrichment and RCA technique, and its content were related to the progression of HBV disease and serum infection markers. It could predict the effect of antiviral therapy.

**[Key words]** magnetic nanoparticle enrichment; rolling ring amplification; hepatitis B virus; cccDNA; peripheral blood mononuclear cells

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染呈全球流行性趋势,据统计全世界范围内有近 20 亿人曾经感染 HBV,慢性 HBV 携带者超过 2.5 亿<sup>[1]</sup>。我国是 HBV 感染最高发国家,目前有超过 9 000 万慢性 HBV 携带者,乙型病毒性肝炎(简称乙肝)相关肝硬化、肝癌更是其死亡主要因素<sup>[2]</sup>。共价闭合环状 DNA(cccDNA)通过 HBV 病毒复制进入宿主细胞核,HBV cccDNA 水平较低,但却是 HBV 复制不可缺少关键分子;它是 HBV 前基因组及 RNA 转录的原始模板<sup>[3]</sup>,可影响 HBV 对宿主的感染状态,而清除细胞核 HBV cccDNA 是治愈 HBV 感染的标志。HBV 主要在肝细胞内复制,但对肝细胞之外的其他细胞也具有泛嗜性,单个核细胞是可以被 HBV 感染的免疫活细胞,有研究显示在外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)中能检测出 HBV DNA 及 HBV cccDNA<sup>[4]</sup>。但是细胞内 HBV cccDNA 含量低,要获取高纯度 HBV cccDNA 难度较大,本研究通过磁性纳米富集技术及滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)技术测定 HBV cccDNA 水平,以期构建 HBV cccDNA 高灵敏度检测方法,并探讨检测 PBMC 中 HBV cccDNA 临床意义。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择西南医科大学附属医院 2016 年 1 月至 2018 年 1 月收治的 HBV 感染者 98 例为 HBV 组,其中男 62 例,女 36 例,年龄( $39.51 \pm 7.22$ )岁,急性 HBV 感染 8 例,慢性 HBV 感染 59 例,肝硬化 23 例,肝衰竭 8 例。诊断标准:所有纳入病例均符合《病毒性肝炎防治方案》<sup>[5]</sup>。排除标准:(1)妊娠期妇女;(2)人类免疫缺陷病毒(HIV)感染者;(3)甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、戊型肝炎病毒感染;(4)需要抗病毒治疗患者曾经使用阿德福韦酯片或恩替卡韦片治疗无效者。同时选择该院 100 例健康体检者为对照组。所有纳入研究者均知晓本研究目的、过

程及意义,签署知情同意书。本研究得到医院伦理委员会支持。

## 1.2 方法

**1.2.1 标本采集** 血液标本:取患者空腹静脉血肝素抗凝、乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝各 5 mL,肝素抗凝血 3 500 r/min 离心 5 min,取上层血清保存于一 20 °C 冰箱,待测乙肝两对半、丙氨酸氨基转移酶(ALT)及天冬氨酸氨基转移酶(AST)。EDTA 抗凝血用于提取 PBMC。肝组织活检:患者行 B 超引导下肝穿刺取活检组织,经固定、脱水、包埋、切片等程序后以苏木素-伊红(HE)染色,由有经验的病理学医师独立完成病理分级。

**1.2.2 HBV 感染标志物测定** 实时荧光定量 PCR 检测血清 HBV DNA(Applied Biosystems 实时荧光定量 PCR 仪, Thermo 公司, 美国),用全自动化学发光仪测定血清 HBsAg、HBeAg 水平(雅培 I-2000)。均采用配套成品试剂盒,严格按照试剂盒说明书进行操作。

## 1.2.3 HBV cccDNA 测定

**1.2.3.1 PBMC 提取** 采用淋巴细胞分离液梯度离心提取 PBMC,完成后以 0.9%生理盐水洗涤 3 次,留细胞沉淀,保存于一 20 °C 冰箱待测。

**1.2.3.2 HBV cccDNA 提取** 首先构建针对 HBV cccDNA 的特异性探针磁性纳米微球:(1)20 mL 氯化铁( $FeCl_3, 1.0 \text{ mol/L}$ )与 5 mL 氯化亚铁( $FeCl_2, 2.0 \text{ mol/L}$ )溶液混合均匀加入到 250 mL( $0.7 \text{ mol/L}$ )的氨水溶液中,离心分离后所得的黑褐色沉淀以超纯水洗至中性,干燥后得到磁性氯化铁( $Fe_3O_4$ )纳米粒子;(2)以 1:1:4 比例均匀混合 Triton X-100、正己醇和环己烷,加入前述方法制订  $Fe_3O_4$  纳米分子,及正硅酸乙酯、氨水(质量分数为 28%~30%),持续搅拌 24 h 后用丙酮破坏乳化,并在一定的外磁场下收集颗粒,即为硅壳磁性纳米颗粒;(3)将链霉亲和素溶液(2.5

mg/mL)加入到 5 mg 前述方法制订的硅壳磁性纳米颗粒中,在 4 °C 下恒温振荡培育 24 h, PBS 缓冲液洗涤 3 次,用 2% 的戊二醛溶液固定纳米颗粒表面的链霉菌亲和素,再将生物素标记的针对 HBV cccDNA 特异序列探针通过与修饰在硅壳磁性纳米颗粒表面的亲和素偶联,即 HBV cccDNA 磁性纳米颗粒。以基因组提取试剂盒(Thermo,美国)提取总 PBMC 内总 DNA,严格按照试剂盒说明书进行,分光光度仪 260/280 吸光度值在 1.6~2.0 为合格 DNA 标本,将得到的总 DNA 用 PSAD 酶(Plasmid-Safe™ ATP-Dependent DNase)酶切消化以除去非 cccDNA, -80 °C 冰箱保存备用。利用构建成功 HBV cccDNA 功能化纳米颗粒富集、分离 HBV cccDNA,详细操作参照文献[6]。

**1.2.3.3 HBV cccDNA 检测 RCA:**以 HBV 高度保守区域分别设计 8 条与 HBV cccDNA 正链、负链互补的引物(上海生工),序列见表 1。RCA 反应体系:10×Phi29 DNA 聚合酶 Buffer 1 μL、引物(R1-R81) 4 μL、DNA 4 μL、ddH<sub>2</sub>O 补足 1 μL,总体积:10 μL,经 95 °C 3 min、50 °C 15 s、30 °C 15 s、20 °C 10 min 反应后,再向混合液加入 Phi29 DNA 聚合酶 1 μL(10 U/μL)、10×Phi29 DNA 聚合酶 Buffer 1 μL、引物(R1-R81) 4 μL、BSA 1 μL(0.4 mg/mL)、4×dNTP 混合物 3 μL,总体积:20 μL,30 °C 水浴 16 h,65 °C 水浴 10 min,保留 RCA 产物。以 RCA 产物为模板,进行跨缺口引物介导的实时荧光定量 PCR 反应,引物 Prime1:5'-GGG GCG CAC CTC TCT TTA-3', Prime2:5'-AGG CAC AGC TTG GAG GC-3',具体操作参照文献[7]。

**1.2.3.4 标准曲线** 选择 1×10<sup>4</sup>、1×10<sup>5</sup>、1×10<sup>6</sup>、1×10<sup>7</sup> copies/mL 浓度梯度标准品作标准曲线,判断该方法敏感性。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,首先对数据进行正态性分布检验。计数资料采用  $\chi^2$  检验。非正态分布计数资料以中位数描述,采

用 Wilcoxon 符号秩和检验。HBV cccDNA 与感染指标采用 Spearman 秩相关性分析。采用受试者工作特征曲线(ROC)分析 HBV cccDNA 对抗病毒治疗效果进行预测。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

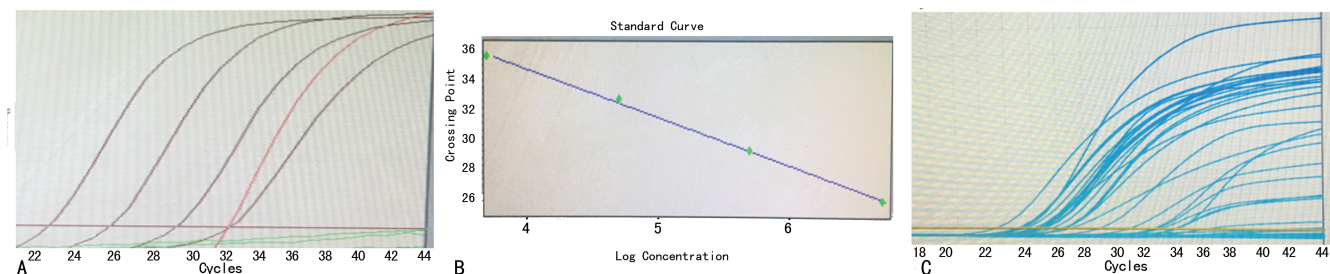
**2.1 方法学分析** 采用 1×10<sup>4</sup>、1×10<sup>5</sup>、1×10<sup>6</sup>、1×10<sup>7</sup> copies/mL 浓度梯度标准品做标准曲线分析显示:扩增曲线平行性好、浓度梯度拐点明显、无交叉现象,曲线斜率稳定,敏感性较高。患者 HBV cccDNA 扩增曲线显示:阳性标本、阴性标本曲线清晰,均为典型扩增曲线,无非特异性扩增曲线,不同浓度阶段曲线分界清楚,见图 1。

**2.2 HBV cccDNA 阳性率** 98 例 HBV 感染患者中 HBV cccDNA 阳性 61 例(62.24%),对照组中 HBV cccDNA 阳性 0 例。HBV 感染不同病情阶段 HBV cccDNA 阳性率比较差异有统计学意义( $P = 0.00$ ),HBV 感染伴肝衰竭、HBV 感染伴肝硬化患者 HBV cccDNA 阳性率明显高于急性 HBV、慢性 HBV 感染,其中 HBV 感染伴肝衰竭阳性率最高,达到 100% ( $P < 0.05$ );急性 HBV、慢性 HBV 感染间 HBV cccDNA 阳性率比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 2。

表 1 滚环扩增引物序列

引物名称	序列(5'-3')
RCA1	AAT CCT CAC AAT A * C * C
RCA2	ACC TAT TCT CCT C * C * C
RCA3	CCT ATG GGA GTG G * G * C
RCA4	CCT TTG TCC AAG G * G * C
RCA5	ATG CAA CTT TTT C * A * C
RCA6	CTA GCA GAG CTT G * G * T
RCA7	TAG AAG AAG AAC T * C * C
RCA8	GGG CCC ACA TAT T * G * T

\*:碱基硫化



A:标准品扩增曲线;B:标准品斜率;C:标本扩增曲线

图 1 扩增曲线

**2.3 不同病理分期及 HBV DNA 水平患者 HBV cccDNA 水平比较** 经病理活检进行组织炎症活动度分级、纤维化分期,34 例患者分期小于 G<sub>2</sub>/S<sub>2</sub> 期,64

例患者分期在 G<sub>2</sub>/S<sub>2</sub> 或以上,≥G<sub>2</sub>/S<sub>2</sub> 期患者 HBV cccDNA 水平(中位数:5.8 lg copies/mL)明显高于小于 G<sub>2</sub>/S<sub>2</sub> 期患者(中位数:3.7 lg copies/mL),两组比



较差异有统计学意义 ( $Z = 4.378, P = 0.001$ )。将 HBV 患者按照 HBV DNA 水平进行分组,  $\geq 1 \times 10^5$  copies/mL 患者 HBV cccDNA 水平(中位数: 6.2 lg copies/mL)明显高于小于  $1 \times 10^5$  copies/mL 患者(中位数: 4.1 lg copies/mL), 两组比较差异有统计学意义 ( $Z = 4.102, P = 0.001$ ), 见图 2。

表 2 不同 HBV 感染阶段 HBV cccDNA 阳性率比较 [n(%)]

病情阶段	n	阴性	阳性
急性 HBV	8	5(62.50)	3(37.50)
慢性 HBV	59	29(49.15)	30(50.85)
肝硬化	23	3(13.04) <sup>ab</sup>	20(86.96) <sup>ab</sup>
肝衰竭	8	0 <sup>ab</sup>	8(100.00) <sup>ab</sup>
合计	98	37(37.76)	61(62.24)

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与急性 HBV 比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与慢性 HBV 比较

2.4 HBV cccDNA 与感染指标相关性分析 HBV

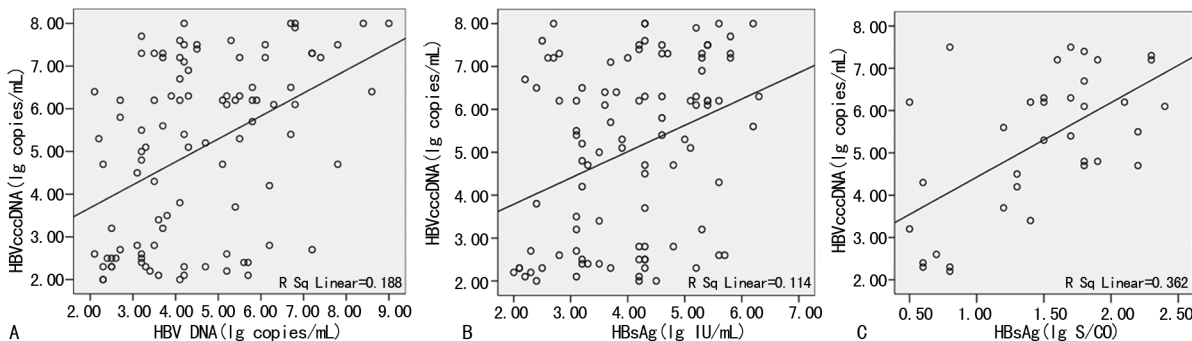


图 3 PBMC 内 HBV cccDNA 与感染指标相关性分析

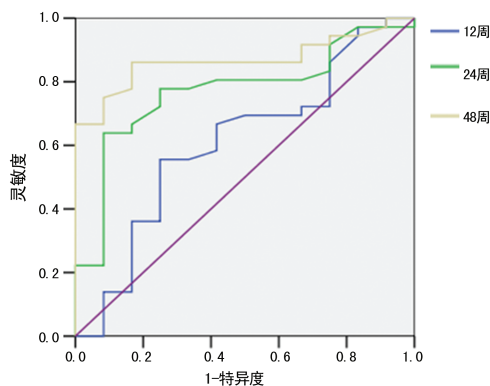


图 4 PBMC 内 HBV cccDNA 对抗病毒治疗效果 ROC 曲线

2.5 PBMC 内 HBV cccDNA 对抗病毒治疗效果 ROC 曲线分析 共有 40 例患者需要抗病毒治疗, 以 HBV 患者抗病毒治疗后出现病毒应答为标准, 分析 HBV cccDNA 对抗病毒治疗效果判断价值。在抗病毒治疗 12 周时 PBMC 内 HBV cccDNA 量对病毒应答无明显预测作用, ROC 曲线下面积 (AUC) 为 0.608 (95% CI: 0.415~0.800),  $P = 0.268$ 。在抗病毒治疗 24、48 周时 PBMC 内 HBV cccDNA 量可对病毒应答明显预测, AUC 分别为 0.771 (95% CI: 0.625~

患者 PBMC 内 HBV cccDNA 水平与血清 HBV DNA 呈明显正相关性 ( $r = 0.437, P = 0.000$ ), 见图 3A。HBV cccDNA 与血清感染性指标相关性分析显示, PBMC 内 HBV cccDNA 水平与 HBsAg 呈明显正相关性 ( $r = 0.338, P = 0.001$ ), 见图 3B; 98 例患者中有 35 例患者 HBeAg 阳性, HBeAg 阳性患者 PBMC 内 HBV cccDNA 水平与 HBeAg 水平呈明显正相关性 ( $r = 0.521, P = 0.001$ ), 见图 3C。

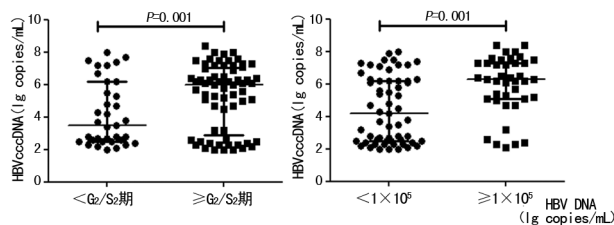


图 2 不同病理分期及 HBV DNA 水平患者 HBV cccDNA 水平比较

0.917),  $P = 0.005, 0.868$  (95% CI: 0.767~0.969),  $P = 0.000$ 。ROC 分析提示, 在治疗 48 周时 HBV cccDNA 为 3.2 lg copies/mL 时可作为预测出现病毒应答效应的截面, 约登指数达到最大, 见图 4。

3 讨论

HBV cccDNA 无论在肝脏组织或其他感染细胞内均以较低水平存在, 但是其可通过 HBV 前基因组及 RNA 转录来调控 HBV 病毒在宿主内复制。HBV cccDNA 的清除预示着病毒在体内生命周期终结, 有研究认为清除细胞核 HBV cccDNA 是治愈 HBV 感染的标志<sup>[3]</sup>。在 HBV 感染、病情监测及治疗相关指标中, 单纯检测 HBV DNA 对临床分析具有局限性, 而 HBV cccDNA 水平测定可弥补不足, 二者综合分析会更真实反映宿主体内 HBV 复制及感染状态, 能够为临床提供可靠的治疗依据<sup>[8]</sup>。PBMC 是免疫活细胞, HBV 患者出现免疫抵抗能力下降可能与病毒在 PBMC 内长期复制而导致的免疫功能紊乱有关<sup>[9]</sup>。HBV 持续慢性感染 PBMC 可能参与母婴垂直传播、肝移植后 HBV 复发等<sup>[10]</sup>。PBMC 内 HBV cccDNA 水平与宿主肝脏组织 HBV 感染、复制情况具有一致性<sup>[11]</sup>, 但 HBV cccDNA 在 PBMC 内水平较低, 受限

于检测方法的灵敏度与特异度,目前尚不能作临床常规检测。

国内外学者已建立多种 HBV cccDNA 检测方法,由于细胞内水平低难以获得高纯度 cccDNA,以及与 cccDNA 具有同源序列的双链 DNA (rcDNA) 干扰,这些检测方法都难以获得理想的灵敏度<sup>[12]</sup>。磁性纳米富集技术利用磁性微粒表面功能化基团特异亲和功能,可特异性地实现互补目标单链核苷酸片段的高效快速富集分离,本课题组在前期已经完成该方法特异性纳米颗粒的制备,其性能得到验证<sup>[7]</sup>。RCA 具有很强扩增能力,在单核苷酸多态性、细胞原位分析等微量核酸测定有广泛应用<sup>[13]</sup>,与传统 PCR 比较,RCA 只能在特异性聚合酶作用下扩增环状 DNA 模板,可有效避免 rcDNA 对 cccDNA 扩增的影响。本研究选择磁性纳米富集联合 RCA 技术来测定 PBMC 内 HBV cccDNA,其扩增曲线清晰、典型,具有稳定的斜率、平行性。

本研究纳入 98 例 HBV 感染患者,HBV cccDNA 阳性率随着病情进展其阳性率也随之增加,肝硬化、肝衰竭患者 PBMC 内 HBV cccDNA 阳性率明显升高 ( $P < 0.05$ )。而高 HBV DNA 载量患者 PBMC 内 HBV cccDNA 拷贝数明显高于低 HBV DNA 载量患者,HBV DNA 也与 HBV cccDNA 呈明显正相关性 ( $r = 0.437, P = 0.000$ ),表明 HBV DNA 复制可能依赖 HBV cccDNA,其水平可在一定程度上反映 HBV cccDNA 存在情况。肝脏组织病理分期是判断疾病进展的重要依据。 $\geq G_2/S_2$  期患者 PBMC 内 HBV cccDNA 拷贝数明显高于小于  $G_2/S_2$  期以下患者 ( $Z = 4.378, P = 0.001$ ),提示 HBV cccDNA 在宿主体内持续存在可能导致疾病进展。HBV cccDNA 是 HBV DNA 复制模板,HBV cccDNA 本身不会引起肝组织损伤,但是其通过上调 HBV DNA 复制增加宿主体内病毒载量,以此激发免疫系统对 HBV 感染肝细胞进行攻击导致肝脏组织受损,而作为免疫活细胞的 PBMC 感染 HBV 可能会加重这种病理应答<sup>[14]</sup>。

HBsAg、HBeAg 是 HBV DNA 转录 mRNA 翻译合成的 HBV 特异性病毒蛋白,其转录、调控及清除机制复杂,HBV cccDNA 在此过程中如何发挥作用目前尚未完全阐明<sup>[15-16]</sup>。本研究结果显示,PBMC 内 HBV cccDNA 与血清 HBsAg 呈明显正相关 ( $r = 0.338, P = 0.001$ ),提示 PBMC 内 HBV cccDNA 可能会影响 HBV 表达。有学者认为以血清 HBsAg 衡量肝组织内 HBV cccDNA 还需考虑 HBeAg 状态,本研究发现 HBeAg 阳性患者 HBeAg 与 PBMC 内 HBV cccDNA 存在明显正相关性 ( $r = 0.521, P = 0.001$ )。HBeAg 阳性是 HBV 复制活跃标志,HBV cccDNA 在细胞内活动度增加可能会优先上调 HBeAg 水平<sup>[17]</sup>。但是 HBeAg 阴性并不能表示 HBV cccDNA 或 HBV DNA 处于非活动状态,因为

部分患者存在 HBV 病毒前 C 区变异,HBeAg 表达受限或不能表达。PBMC 作为免疫活细胞,具有丰富的免疫信号传导通路,能够将细胞核内 HBV cccDNA 遗传信息进行有效输出,影响 HBsAg、HBeAg 等特异性蛋白表达。

HBsAg 阴转被认为是治疗 HBV 感染的最理想状态,但在实际抗病毒治疗中出现 HBsAg 完全阴转的病例非常少见,这可能与少量 HBV cccDNA 能够稳定存在感染细胞内且不易受药物影响有一定关系。细胞内 cccDNA 是慢性 HBV 持续感染的最主要原因,并且与抗病毒治疗后复发相关,清除 HBV cccDNA 也被认为是治疗 HBV 的根本途径。本研究进一步分析 PBMC 内 HBV cccDNA 对 HBV 抗病毒治疗效果判断价值,结果显示在抗病毒治疗 24、48 周时 PBMC 内 HBV cccDNA 水平可对病毒应答进行判断,在 48 周时具有最佳判断效果,表明 PBMC 内 HBV cccDNA 可以用于评价抗病毒治疗效果,在治疗过程中可将其作为常规监测指标,进一步凸显 PBMC 内 HBV cccDNA 检测的临床意义。

综上所述,本研究证实 HBV 可感染 PBMC,利用磁性纳米富集及 RCA 可检测 PBMC 内 HBV cccDNA。PBMC 内 HBV cccDNA 与 HBV 疾病进展有一定关系,也与血清 HBV DNA、HBsAg、HBeAg 水平相关,可作为抗病毒治疗效果判定指标,对 HBV 患者检测 PBMC 内 HBV cccDNA 具有重要临床意义。

## 参考文献

- [1] AKBAR S M, AL-MAHTAB M, KHAN S I. Nature of Host Immunity during Hepatitis B Virus Infection and designing Immune Therapy[J]. Euroasian J Hepatogastroenterol, 2018, 8(1): 42-46.
- [2] WANG C, XIA B, NING Q, et al. High prevalence of hepatitis B virus infection in patients with aggressive B cell non-Hodgkin's lymphoma in China[J]. Ann Hematol, 2018, 97(3): 453-457.
- [3] WEI Z Q, ZHANG Y H, KE C Z, et al. Curcumin inhibits hepatitis B virus infection by down-regulating cccDNA-bound histone acetylation[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(34): 6252-6260.
- [4] SHI X, WANG X, XU X, et al. Impact of HBV replication in peripheral blood mononuclear cell on HBV intrauterine transmission[J]. Front Med, 2017, 11(4): 548-553.
- [5] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华传染病杂志, 2001, 19(1): 56-62.
- [6] 郭永灿, 王友强, 魏聪, 等. HBV 共价闭环状 DNA 功能化纳米颗粒制备及鉴定[J]. 福建医科大学学报, 2016, 50(6): 370-374.
- [7] ZHONG Y, HAN J, ZOU Z, et al. Quantitation of HBV covalently closed circular DNA in micro formalin fixed paraffin-embedded liver tissue using rolling(下转第 1471 页)

- [2] GAESTEL M. MAPK-activated protein kinases (MKs): novel insights and challenges[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2016(3): 88.
- [3] SARRAZY V, KOEHLER A, CHOW M L, et al. Integrins  $\alpha v \beta 5$  and  $\alpha v \beta 3$  promote latent TGF- $\beta 1$  activation by human cardiac fibroblast contraction[J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 102(3): 407-417.
- [4] 陈伟, 付小兵, 葛世丽, 等. 胎儿和出生后机体皮肤内 p38MAPK 及 MAPKs 基因表达变化的比较性研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2005, 19(4): 291-295.
- [5] 杜启翠, 肖文林, 薛令法, 等. p38 丝裂原活化蛋白激酶在周期性牵张力诱导人增生性瘢痕成纤维细胞向肌成纤维细胞分化中的作用[J]. *中华口腔医学杂志*, 2013, 48(10): 615-620.
- [6] BISWAS M, KUMAR S R P, TERHORST C, et al. Gene therapy with regulatory T cells: a beneficial alliance[J]. *Front Immunol*, 2018(9): 554.
- [7] LOUKOGEORGAKIS S P, FLAKE A W. In utero stem cell and gene therapy: current status and future perspectives[J]. *J Pediatr Surg*, 2014, 24(3): 237-245.
- [8] DITTO A J, REHO J J, SHAH K N, et al. In vivo gene delivery with L-tyrosine polyphosphate nanoparticles[J]. *Mol Pharm*, 2013, 10(5): 1836-1844.
- [9] JOYEUX L, DANZER E, LIMBERIS M P, et al. In utero lung gene transfer using adeno-associated viral and lentiviral vectors in mice [J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2014, 25(3): 197-205.
- [10] STITELMAN D H, BRAZELTON T, BORA A, et al. Developmental stage determines efficiency of gene transfer to muscle satellite cells by in utero delivery of adeno-associated virus vector serotype 2/9[J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2014(1): 14040.
- [11] STITELMAN D H, BRAZELTON T R, ENDO M, et al. Life-long transgene expression in skeletal muscle without transduction of satellite cells following embryonic myogenic progenitor transduction by lentivirus administered in utero[J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(16): 1878-1887.
- [12] ZHOU D Z, GAO Y S, AIED A, et al. Highly branched poly( $\beta$ -amino ester)s for skin gene therapy [J]. *J Control Release*, 2016, 244(Pt B): 336-346.
- [13] GAUGLITZ G G, JESCHKE M G. Combined gene and stem cell therapy for cutaneous wound healing[J]. *Mol Pharm*, 2011, 8(5): 1471-1479.
- [14] ARAGONA M, BLANPAIN C. Gene therapy: Transgenic stem cells replace skin[J]. *Nature*, 2017, 551(7680): 306-307.
- [15] SYLVESTER K G, NESBIT M, RADU A, et al. Adenoviral-mediated gene transfer in wound healing: acute inflammatory response in human skin in the SCID mouse model[J]. *Wound Repair Regen*, 2000, 8(1): 36-44.
- [16] HIRSCH T, ROTHOEFT T, TEIG N, et al. Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells [J]. *Nature*, 2017, 551(7680): 327-332.

(收稿日期: 2018-09-20 修回日期: 2019-01-04)

(上接第 1466 页)

- circle amplification in combination with real-time PCR[J]. *Clin Chim Acta*, 2011, 412(21/22): 1905-1911.
- [8] REVILL P, LOCARNINI S. Antiviral strategies to eliminate hepatitis B virus covalently closed circular DNA (cccDNA) [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2016, 30(10): 144-150.
- [9] SHI X, WANG X, XU X, et al. Impact of HBV replication in peripheral blood mononuclear cell on HBV intrauterine transmission[J]. *Front Med*, 2017, 11(4): 548-553.
- [10] JOURDAIN G, NGO-GIANG-HUONG N, HARRISON L, et al. Tenofovir versus placebo to prevent perinatal transmission of hepatitis B[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(10): 911-923.
- [11] GAO S, DUAN Z P, CHEN Y, et al. Compartmental HBV evolution and replication in liver and extrahepatic sites after nucleos(t)ide analogue therapy in chronic hepatitis B carriers[J]. *J Clin Virol*, 2017, 94(1): 8-14.
- [12] RYBICKA M, WOZIWODZKA A, ROMANOWSKI T, et al. Differences in sequences between HBV-relaxed circular DNA and covalently closed circular DNA[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2017, 6(6): e55-62.
- [13] MA J, WU L, LI Z, et al. Versatile Electrochemiluminescence assays for PEDV antibody based on rolling circle amplification and Ru-DNA nanotags [J]. *Anal Chem*, 2018, 90(12): 7415-7421.
- [14] LUCIFORA J, BONNIN M, AILLOT L, et al. Direct antiviral properties of TLR ligands against HBV replication in immune-competent hepatocytes [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 5390-5398.
- [15] LIU Y, ZHAO M, GONG M, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication via HBV DNA cleavage by Cas9 from *Staphylococcus aureus* [J]. *Antiviral Res*, 2018, 152(1): 58-67.
- [16] GAO Y, LI Y, MENG Q, et al. Serum hepatitis B virus DNA, RNA, and HBsAg; which correlated better with intrahepatic covalently closed circular DNA before and after nucleos(t)ide analogue treatment? [J]. *J Clin Microbiol*, 2017, 55(10): 2972-2982.
- [17] WEI Z Q, ZHANG Y H, KE C Z, et al. Curcumin inhibits hepatitis B virus infection by down-regulating cccDNA-bound histone acetylation [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(34): 6252-6260.

(收稿日期: 2018-08-02 修回日期: 2018-12-10)