

The Research Status of Hepatitis B Virus cccDNA

Ning Wang

The Poverty Alleviation and Development Office of Daozhen County, Zunyi Guizhou
Email: 714055748@qq.com

Received: Jun. 4th, 2015; accepted: Jun. 20th, 2015; published: Jun. 26th, 2015

Copyright © 2015 by author and Hans Publishers Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

The hepatitis B virus (HBV) is a kind of small DNA virus. The original template of covalently closed circular DNA (cccDNA) HBV is very important for the replication of the hepatitis B virus and the establishment of infection status. The progress of the formation of cccDNA, the methods of detection and the impact of antiviral drugs were reviewed in this paper.

Keywords

HBV, rcDNA, cccDNA

乙肝病毒cccDNA的研究现状

王 宁

贵州省道真县扶贫开发办公室, 贵州 遵义
Email: 714055748@qq.com

收稿日期: 2015年6月4日; 录用日期: 2015年6月20日; 发布日期: 2015年6月26日

摘 要

乙型肝炎病毒(HBV)是一种小DNA病毒, 共价闭合环状DNA (cccDNA)是HBV的原始复制模板, 对乙肝病毒的复制及感染状态的建立具有重要意义。本文旨在对近年来有关cccDNA的形成、常用检测方法、抗病

毒药物对其的影响等方面的进展作一综述报道。

关键词

乙型肝炎病毒，松弛环状双链DNA，共价闭合环状DNA

1. 引言

乙型肝炎病毒基因组为双链松弛环状 DNA (rcDNA)。HBV 感染发生后，HBVDNA 进入细胞，rcDNA 转化为共价闭合环状 DNA (cccDNA)，并以 cccDNA 为模板开始一系列的病毒复制过程。HBV 复制是一种保守的机制，在转录后模板 cccDNA 仍然完整，并且可反复转录，所以 cccDNA 是嗜肝病毒持续感染的关键因素，是 HBV 复制的突出标志，也是评价 HBV 感染状态及药物疗效最重要的指标[1]。

2. HBV cccDNA 的形成与调节

在感染的早期阶段细胞核内 cccDNA 合成的途径为：HBV 进入细胞后，在胞浆内脱壳，DNA 的正链在 DNA 聚合酶作用下形成全长的 rcDNA [2]。rcDNA 进入肝细胞核中解脱负链 5'端连接的末端蛋白、正链 5'端的 RNA 残段；依赖宿主细胞的 DNA 聚合酶补齐两条链上的缺口，并进一步折叠、扭曲形成超螺旋结构的 cccDNA，并以 cccDNA 为模板转录为不同大小 mRNA (3.5 Kb、2.4 Kb、2.1 Kb、0.8 Kb mRNA)，从而翻译各种病毒蛋白。其中 3.5Kb 的 mRNA 作为逆转录模板，利用病毒的逆转录酶合成全长的基因组负链 DNA，再以负链 DNA 作为模板，通过病毒 DNA 聚合酶的作用，合成正链 DNA，与负链 DNA 一起组成新的 HBV rcDNA。新合成的 HBV rcDNA 一方面进入细胞核内，转化为新的 cccDNA，补充细胞内的 cccDNA 库，使每个肝细胞中保持大约 5~50 个 cccDNA 分子；另一方面与病毒蛋白装配成新的完整 HBV，释放至细胞外，再感染健康的肝细胞[3]。

另外还有一种次要的 HBV cccDNA 合成方式。在这种方式里，由于正链 DNA 在适当区域合成失败而产生线性双链 DNA，通过在线性 DNA 末端的非同源重组而被有效地转换成 HBV cccDNA。这种方式产生的一些 HBV cccDNA 分子能产生前基因组。由于非同源重组产生的变异，多数前基因组仅产生线性双链 DNA，这些线性双链 DNA 重组产生更多 HBV cccDNA，这种过程称为非法复制。因为由此产生的下一代 HBV cccDNA 在非同源重组处的序列上区别于亲代分子，由此推测细胞内低水平病毒的这种“非法复制”可能提供此类细胞在抗原特异性细胞免疫反应中的一种生存优势[4]。

在稳定感染的细胞中，核内 cccDNA 维持在一定的水平，以满足病毒复制而对细胞无毒性，这一调节作用可能通过细胞主导的过程或病毒主导的负反馈机制来实现。一个感染病毒体在感染肝细胞后只产生一个 cccDNA 分子，但处于稳定感染的每个肝细胞内有 50~100 个 cccDNA 拷贝，其原因就是 rcDNA 又在胞内转换成 cccDNA。

3. HBV cccDNA 的常用检测方法

根据 cccDNA 与 rcDNA 在结构和理化特性上的不同，可以建立检测 cccDNA 的方法：

cccDNA 与 rcDNA 在结构和理化特性上的不同：1) rcDNA 能与蛋白质共价结合，cccDNA 则不能；2) rcDNA 的双链是不对称的，全长的一链与病毒 mRNA 互补，为负链，较短的一链为正链。在正链和负链上均存在缺口，两链 DNA 通过 5'端 250~300 个互补碱基的氢键作用形成部分环状结构，而非超螺旋结构；cccDNA 的两条链均是完整的，形成超螺旋结构；3) 由于正链和负链上均有缺口存在，rcDNA 可以被一些能够切除单链或含有缺口 DNA 的核酸酶如 Plasmid-Safe™ ATP-Dependent Dnase、绿豆核酸酶

(mung bean nuclease)等降解成寡核苷酸或单核苷酸，而 cccDNA 则由于双链结构完整，不会被上述酶降解[5]-[7]。

常用检测方法：

3.1. Southern Blot

HBV cccDNA 以往多用 Southern blot 方法进行检测，它的基本过程包括：电泳分离酶解后的 DNA 片断，将 DNA 片断转移到合适的固相支持物如硝酸纤维素膜或尼龙膜上，将标记的探针与膜上的 DNA 片断杂交，分析杂交信号。以往多用 Southern 印记方法进行 HBV cccDNA 检测，是一种定性的检测方法。该方法是分子生物学的经典方法，但对操作者的技术要求较高，且步骤繁琐，灵敏度较低[8]。

3.2. 普通 PCR

基于 rcDNA 的正链和负链上均存在缺口，故可以设计跨越两个缺口的引物，使 rcDNA 不被扩增，cccDNA 由于有完整的双链可以被有选择地扩增。汪菁[9]等对普通 PCR 法进行了优化，应用套式 PCR 结合直接测序法测得 HBVcccDNA 的 YMDD 位点，证实了肝内 cccDNA YMDD 自然变异株的存在。

3.3. 实时荧光定量 PCR

He 等[10]建立了实时荧光定量检测 cccDNA 的方法。他们将具有发光基团和淬灭基团的 TaqMan 探针设计于负链缺口的下游，与负链互补。在上游引物的引导下，若负链是完整的，Taq 酶则到达 TaqMan 探针所结合的位点，利用其 5'→3'的外切酶活性将探针切断，从而 3'端的淬灭基团失去对 5'端发光基团的抑制作用，产生荧光信号。若负链含有缺口，由于上游引物引发的链延伸不能通过负链缺口，故不能产生荧光信号。这样，cccDNA 和 rcDNA 得以区分开来。此方法变普通 PCR 法的终点监测为实时动态检测，不需对 PCR 反应产物进行开盖检测，从而减少了 PCR 产物污染的可能。

3.4. 入侵检查(Invader Assay)

入侵检查是近年来刚开始应用的技术。其基本原理是根据目标 DNA 设计一对探针，一个探针称为初始探针(primary probe)，另一个称为入侵探针(invader probe)，初始探针的 5'端一段寡核苷酸序列不与目标 DNA 互补，入侵探针 3'末端的单个碱基不与目标 DNA 互补，Flap 核酸内切酶 I(Flap endonuclease I)将初始探针 5'端不与目标 DNA 互补的寡核苷酸序列剪切下来，之后此段寡核苷酸序列与具有发光基团和淬灭基团的 FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)探针相结合，从而产生荧光信号，能够被实时荧光 PCR 仪器检测[11]。DKHw 等[12]根据此原理，分别设计了与 HBV DR2 区正链下游、负链上游相结合的两种入侵探针，这样当正链、负链均为完整时产生两种荧光信号，从而检测 cccDNA；rcDNA 由于正链含有缺口，只能产生一种荧光信号，得以和 cccDNA 相区分。整合型 HBV DNA 在 DR2 区的 5'端也是一段完整的序列，但整合多发生在 11bp 的 DR 区[12] [21]，Wong DK 等[12]。据此认为用入侵检查技术测到整合型 HBVDNA 的几率应该很低。

有研究表明血清 HBeAg 不能准确反映 HBV cccDNA 水平，而肝组织内的 HBV cccDNA 又是 HBV 在肝细胞内感染的复制状态及其传染程度的更精确地反应，当患者出现血清 HBeAg 阴性时，为了准确表达 HBV 在肝细胞体内的感染状态，使用 HBV cccDNA 作为观察指标能够较为直接的反映肝细胞内感染的真实情况[13]。

由于 cccDNA 主要存在于肝细胞核中，所以认为用肝组织检测 cccDNA 结果较为可靠和准确，但用肝穿获取肝组织临床难以普及，相比较而言血中 cccDNA 的检测较为可行。理论上讲，当肝细胞破坏时，存在于肝细胞核中的 cccDNA 会释放入血，有研究表明其既可作为肝损伤的评价指标，也可用来评估病

毒复制。cccDNA 目前多采用实时荧光定量 PCR 方法检测[14]。

4. 药物对 HBV cccDNA 的影响

4.1. 干扰素

干扰素是一种广谱的抗病毒药，其抗病毒机制是与细胞膜特异性受体结合，在细胞内产生一种“抗病毒蛋白”的酶，此外，它还能增强机体的免疫功能。但干扰素的治疗效果是有限的，长期应用才能抑制 HBV 复制，获得较持久的效应，但长期使用会产生很多不良反应；且其抗病毒作用只限于 HBV DNA，并不能清除存在于肝细胞核内 HBV 的复制模板 cccDNA，也不能清除已与宿主 DNA 整合的病毒基因[3][15]。

4.2. 拉米夫定

拉米夫定为核苷类似物，通过抑制病毒 DNA 聚合酶阻止病毒的复制。使用侵入检测法检测慢性乙型肝炎 82 例外周血的 cccDNA，治疗前平均水平 3.0×10^6 copy/ml，经拉米夫定(100 rag/天)治疗 24 周时，降至 3.3×10^4 copy/ml，52 周时 4.9×10^4 copy/ml。由于其中 15 例出现 YMDD 变异，所以 52 周时外周血 cccDNA 水平比 24 周时略有升高。表明其对 HBV 的抑制作用是可逆的，一旦停用后 HBV 常重新复制，而且也不能完全清除 cccDNA，更不能清除已与细胞基因组整合的病毒。只有长期使用，持续性抑制 HBV 复制，才可获得较为持久性的效应，但是长期治疗部分病人可发生病毒变异，引起耐药性[2][3]。

4.3. 阿德福韦

采用实时定量 PCR 检测肝组织 cccDNA，包括接受阿德福韦治疗的慢性乙型肝炎 22 例，结果表明，阿德福韦(10 rag/天)治疗 48 周后，平均每个肝细胞的 cccDNA 下降 0.8 个对数级，即减少 84%；肝组织内总的 HBV DNA 下降 1.6 个对数级，即减少 98%。病毒感染的细胞数量在治疗前后无明显变化，提示阿德福韦通过非细胞死亡机制降低 cccDNA [2]。

4.4. 恩替卡韦

对恩替卡韦(0.5 mg/天) III 期临床研究入组的部分病例进行了肝细胞内 HBVcccDNA 水平的检测，初步结果表明，治疗 48 周后恩替卡韦降低 HBVcccDNA 的作用强于拉米夫定，而在此前的鸭乙型肝炎模型上已证实，与拉米夫定相比，恩替卡韦对降低鸭肝细胞内 DHBV cccDNA 的水平更为有效，但也不能完全清除病毒[2]。

4.5. 替诺福韦酯

该药物是替诺福韦的酯类前药，口服吸收后迅速水解为替诺福韦，其活性代谢产物二磷酸可竞争进入病毒 DNA 链，导致病毒 DNA 延长受阻，进而抑制病毒复制。其抗病毒作用强，耐药率低，对耐药株、变异株均有抑制作用。对拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦耐药的患者仍有较好的抗病毒作用。但该药物尚未在我国批准上市[16]。

4.6. 克拉夫定

克拉夫定的 3 位羟基，不是一个终止物，而是形成了三磷酸酯 L-FMAU-TP 结合在活性部位，诱导聚合酶构象发生变化，使病毒 DNA 链的合成不能顺利进行。临床试验结果显示其安全性、药代动力学性质及耐受性良好，具有良好的耐受性和抗 HBV 活性[17]。但在进入临床应用后，在克拉夫定治疗的患者中检测到 rtA181T 变异，表明克拉夫定可能产生耐药[18]。

5. 新药物及新方法

5.1. 治疗性 DNA 疫苗

Thermat 等[19]用包含 DHBV 大包膜蛋白基因的质粒作为治疗性 DNA 疫苗,治疗慢性携带 DHBV 的鸭,发现可以显著减少其病毒的复制。更有意义的是,在一些鸭(7/30)的肝细胞内,cccDNA 已被完全清除。提示治疗性 DNA 疫苗可能是一种清除 HBV 感染肝细胞内的 cccDNA、减少复发的有效方法。其他旨在阻断病毒在细胞内复制、转录、翻译,乃至释放的某一个环节的抗病毒药物,则很难清除肝细胞内的 cccDNA。

5.2. 基因治疗

RNA 干扰技术是短小的干扰 RNA (siRNA)通过序列特异性降解目的 mRNA,而起到调节 RNA 表达的作用。有研究表明,siRNA 可特异性降解人免疫缺陷病毒(HIV)和丙型肝炎病毒(HCV)的 genomicRNA,从而抑制病毒复制。同时,有研究表明,HBV 羧基端 siRNA 能显著降低 HBVcccDNA 的水平和 HBV DNA 的复制[20]。这可能是由于 HBV cccDNA 的减少引起其转录为 HBV RNA 水平的降低,最后导致 HBV DNA 复制水平的下降[2]。无疑基因治疗为乙肝治疗带来了新的希望。

6. 小结与展望

嗜肝 DNA 病毒 cccDNA 分子的形成机制,以及在病毒的生物周期中作为前基因组 RNA 和部分基因 mRNA 的模板的重要意义已经明确,但目前尚无手段有效抑制其合成及彻底清除 cccDNA。目前,一方面应积极研制新的抗 HBV 药物,抑制 HBV DNA 合成,减少 HBV DNA 进入细胞形成 cccDNA 库并清除 cccDNA;另一方面应将抗 HBV 药物与免疫调节剂联合应用,提高细胞免疫功能,阻止 HBV 感染细胞,促进 cccDNA 的清除。如能有效地实现上述抗 HBV 策略,将能大大提高治疗效果,并有可能根治 HBV 感染。

参考文献 (References)

- [1] 马艳丽,任万华(2006)乙肝病毒 cccDNA 的研究进展. *临床肝胆病杂志*, **3**, 221-222.
- [2] 许海苗,王慧芬(2007)乙肝病毒 cccDNA 的研究进展. *人民军医*, **5**, 271-273.
- [3] 张涛,高英堂,韩涛(2005)乙肝病毒 cccDNA 的研究进展. *国外医学病毒册*, **6**, 161-164.
- [4] 陈勇,秦波(2007)乙型肝炎病毒 cccDNA 的研究动态. *胃肠病学和肝病学杂志*, **4**, 303-305.
- [5] 赵克开,缪晓辉(2005)乙型肝炎病毒 cccDNA 检测的方法与临床意义. *中华肝脏病杂志*, **4**, 315-317.
- [6] 陆晖,江建宁(2008)HBV cccDNA 检测的研究进展. *内科*, **2**, 213-216.
- [7] 杨德刚,缪晓辉(2007)对乙型肝炎病毒共价闭环状 DNA 的再认识. *中华医学杂志*, **26**, 1867-1869.
- [8] Li, X.M., Yang, Y.B., Hou, H.Y., et al. (2003) Interruption of HBV intrauterine transmission: A clinical study. *World Journal of Gastroenterology*, **9**, 1501-1503.
- [9] 江菁,陈玉,等(2012)乙型肝炎病毒共价闭环状 DNA YMDD 位点基因序列自然变异的检测分析. *临床论著*, **6**, 371-374.
- [10] He, M.L., Wu, J., Chen, Y., et al. (2002) A new and sensitive method for the quantification of HBV cccDNA by real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **295**, 1102-1107.
- [11] Kwiatkowski, R.W., Lyamichev, V., de Arruda, M. and Neri, B. (1999) Clinical, genetic, and pharmacogenetic applications of the invader assay. *Molecular Diagnosis*, **4**, 353-364.
- [12] Wong, D.K., Yuen, M.F., Yuan, H., Sum, S.S., Hui, C.K., Hall, J. and Lai, C.L. (2004) Quantitation of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients. *Hepatology*, **40**, 727-737.
- [13] 黄维亮,徐丹,谢元林(2014)肝组织HBV cccDNA与HBV复制水平的相关性分析. *医学临床研究*, **11**, 2108-2110.

- [14] 陈浩, 张涛 (2013) 乙型肝炎实验室检查研究进展. *医学信息*, **10**, 713-714.
- [15] Wieland, S.F., Spangenberg, H.C., Thimme, R., Purcell, R.H. and Chisari, F.V. (2004) Expansion and contraction of the hepatitis B virus transcriptional template in infected chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 2129-2134.
- [16] 李莉, 孙海霞, 李刚 (2012) 慢性乙型病毒性肝炎抗病毒治疗方案的新探索. *广东医学*, **9**, 1333-1335.
- [17] 徐海苗, 王慧芬 (2006) 核苷类药物治疗慢性乙型肝炎的新进展. *传染病信息*, **3**, 113-115.
- [18] 王洁, 金生 (2014) 乙型肝炎病毒耐药变异及其检测方法研究进展. *现代医药卫生*, **24**, 3711-3713.
- [19] Thermat, A., Rollier, C., Zoulim, F., Trepo, C. and Cova, L. (2003) Progress in DNA vaccine for prophylaxis and therapy of hepatitis B. *Vaccine*, **21**, 659-662.
- [20] 唐世刚, 杨兵厂, 刘莉 (2005) 稳定表达 HBVC 蛋白羧基端 SiRNA 抑制 HBVcccDNA 的实验研究. *中华感染控制杂志*, **7**, 198-201.
- [21] Mason, A.L., Xu, L., Guo, L., Kuhns, M. and Perrillo, R.P. (1998) Molecular basis for persistent hepatitis B virus infection in the liver after clearance of serum hepatitis B surface antigen. *Hepatology*, **27**, 1736-1742.