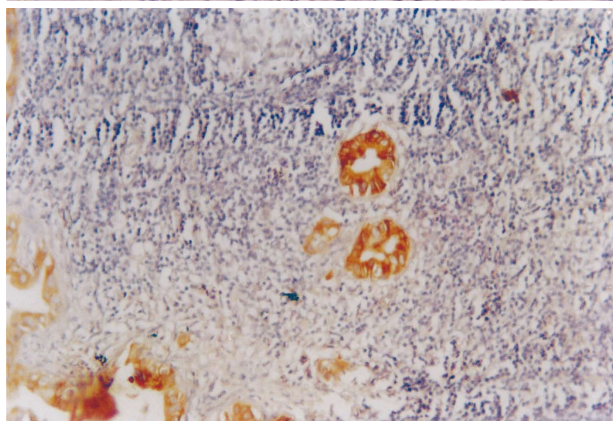
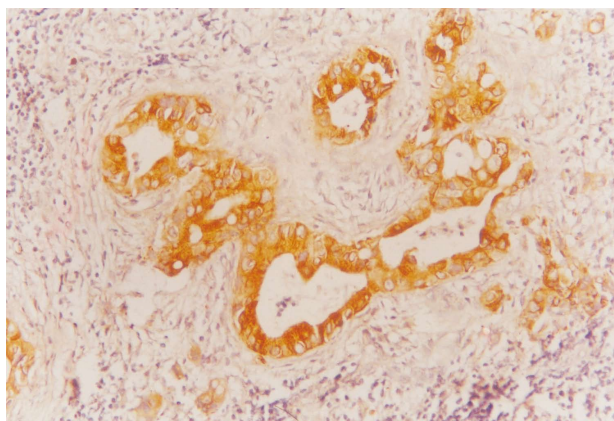
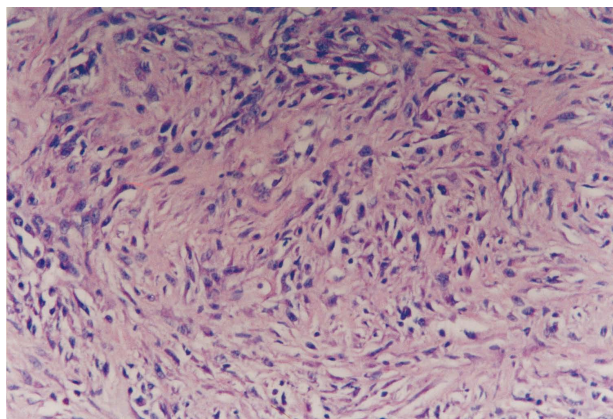
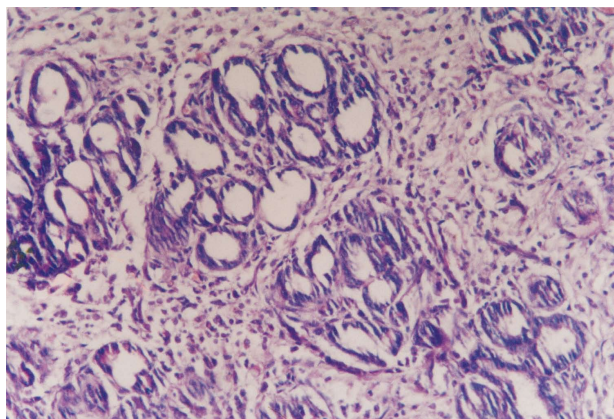


世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2005 年 9 月 28 日 第 13 卷 第 18 期 (Volume 13 Number 18)



18/2005

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,
2003年百种中国杰出学术期刊,

《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学
类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊.

世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,
荷兰《医学文摘库/医学文摘》,
俄罗斯《文摘杂志》收录.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2005 年 9 月 28 日

第 13 卷

第 18 期

(总第146期)

述 评

- 2173 临床试验刍议 谭学瑞, 张学中
2179 RNA 干扰在肝病治疗中的研究进展 韩苏夏, 马瑾璐

基 础 研 究

- 2183 甘草甜素下调基质金属蛋白酶组织抑制因子-1基因的表达
王巧侠, 成军, 郭江, 李文凡, 魏红山
2188 改良聚合酶链反应检测 HBV 共价闭合环状 DNA 汤勃, 王宇明, 刘俊, 张瑞
2193 肝癌细胞 BEL7402 中神经元特异性烯醇化酶的表达
朱爱萍, 张青云, 王雅明, 徐建军, 孙丽
2197 肝移植前受体亚低温对急性肝衰大鼠移植肝脏的保护作用
王志东, 韩德恩, 崔云甫, 姜明山, 张新宇, 曾兆林
2201 慢性丙型肝炎患者 CD4⁺CD25⁺调节性T细胞表达增加 杨江华, 张永祥, 苏川, 孙南雄
2205 草苈蓉乙醇提取物对二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化的治疗作用 朴熙绪, 黄红果, 朴东明
2210 树突状细胞在黏膜免疫模型鼠体内的分布及趋化因子的表达
谢遵江, 贺业春, 贾立敏, 刘颖, 刘丽
2213 塞来昔布对胃癌细胞生长及 ERK2 表达的影响
张勇, 蒋明德, 曾维政, 徐辉, 熊碧君, 翁敏
2217 益气活血软坚解毒含药血清诱导人肝癌细胞系 Bel-7402 细胞的凋亡
李东涛, 孙桂芝, 裴迎霞, 祁鑫, 李杰, 林洪生
2222 肿瘤坏死因子- α 、细胞间黏附分子-1与扑热息痛肝损害
田丰, 王颖, 吴作艳, 王学清, 李岩
2227 SD 大鼠胰腺癌模型组神经生长因子 mRNA 表达
杨竹林, 邓星辉, 杨乐平, 李清龙, 范文涛, 梁珊, 苗雄鹰

文 献 综 述

- 2231 乳酸杆菌作为一种新型活疫苗抗原递送载体 庾庆华, 杨倩
2235 一氧化氮和一氧化氮合酶与肿瘤放疗敏感性的关系 江春平, 丁义涛
2238 Id 基因家族对消化系统实体瘤作用的研究进展
杨海彦, 刘连新, 曲志博, 刘改云, 陈炜, 郭化鑫, 陈曦
2243 影响拉米夫定相关乙型肝炎病毒 YMDD 变异的因素 陆德云, 王甦, 赵连三
2246 成人间活体肝移植中小肝综合征的预防策略 马跃峰, 李相成
2251 肝细胞癌生物标志物的研究进展 王嘉信, 刘连新
2257 肠黏膜免疫调节紊乱介导炎症性肠病的发生 王旭丹, 袁学勤

研 究 快 报

- 2263 sp600125 对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞凋亡及 Caspase-3 蛋白表达的影响 唐文, 蒋明德, 李小安
2266 血小板活化因子对幼鼠肠道免疫屏障功能的影响 王丽杰, 刘冬妍, 孙梅, 赵恂

临 床 经 验

- 2269 肝硬化患者食管静脉曲张的相关因素分析 501 例
崔春吉, 金永日, 朴熙绪, 裴凤郁
2272 中晚期肝门部胆管癌诊治15例
张宗明, 邢海林, 李刚, 刘凯, 朱建平, 宿砚明, 钟华, 郭金星
2275 肝病患者 IgA 和 sIgA 含量变化的临床意义 刘冬妍, 刘沛
2278 全直肠系膜切除术切缘血管内皮生长因子检测的临床意义 战学雷, 田素礼
2281 善宁对急性胰腺炎患者血小板参数变化的影响 黄坚, 陆士奇, 陈建荣

病 例 报 告

- 2284 肝肾联合移植术治疗移植肾慢性失功伴肝硬化 1 例
朱建平, 张宗明, 管德林, 李刚, 黄庆荣, 宿砚明, 陈以安, 刘辉
2287 丙型肝炎肝硬化患者骨髓和血液同时分离出鼠伤寒沙门菌 1 例
郭微媛, 齐桂云, 多丽波, 闫立昕, 孙琪, 张和光

致 谢	2288 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	2187 2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会征文通知 2200 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会暨第三届全国普通外科主任论坛第一轮通知 2209 首届北京地坛感染病学术会议 2221 《世界华人消化杂志》欢迎投稿 2226 2006年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行 2234 WJG和世界华人消化杂志全文网站免费开通 2237 世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊 2250 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 2256 2006年即将召开的国际会议 2262 消化道肿瘤外科治疗2006高级论坛征文通知 2286 中国生物医学基金论文摘要注册方法
封面故事	2227 SD 大鼠胰腺癌模型组神经生长因子 mRNA 表达 杨竹林, 邓星辉, 杨乐平, 李清龙, 范文涛, 梁珊, 苗雄鹰 世界华人消化杂志 2005;13(18):2227-2230 http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2227.asp
国际会议	13th United European Gastroenterology Week, UEGW October 15-20, 2005 American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting October 28-November 2, 2005 ISGCON 2005 November 11-15, 2005 isgcon2005@yahoo.co.in isgcon2005.com Advanced Capsule Endoscopy Users Course November 18-19, 2005 www.asge.org/education II Latvian Gastroenterology Congress November 29, 2005 gec@stradini.lv www.gastroenterologs.lv 2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases December 1-3, 2005 c.chase@imedex.com www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm 10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 isde@sapmea.asn.au www.isde.net

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(半月刊)

创 刊 1993-01-15
改 刊 1998-01-25
出 版 2005-09-28
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生

编辑部主任 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁

英文编辑 张海宁 排版校对 张敏 张勇 李琪

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街77号

出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
E-mail: wcjd @ wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

印刷 北京科信印刷厂

发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京市399信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市2345信箱)
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录.

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

2005年版版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

邮发代号
82-262

国外代号
M 4481

国内定价
每期24.00元 全年576.00元

广告经营许可证
1401004000050

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

September 2005 Contents in Brief Volume 13 Number 18

EDITORIAL

Meager opinions on clinical experimentation

Tan XR, Zhang XZ 2173

Advancement of RNA intervention in the treatment of hepatic diseases

Han SX, Ma JL 2179

BASIC RESEARCH

Glycyrrhizin down-regulates expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1

Wang QX, Cheng J, Guo J, Li WF, Wei HS 2183

Detection of hepatitis B virus cccDNA with modified polymerase chain reaction

Tang B, Wang YM, Liu J, Zhang R 2188

Expression of human neuron-specific enolase gene in human hepatocellular cancer cells BEL7402

Zhu AP, Zhang QY, Wang YM, Xu JJ, Sun L 2193

Moderate hypothermia therapy for acute liver failure in rats before liver transplantation

Wang ZD, Han DE, Cui YF, Jiang MS, Zhang XY, Zeng ZL 2197

Increase of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood of patients with chronic hepatitis C

Yang JH, Zhang YX, Su CH, Sun NX 2201

Therapeutic role of ethanolic extract of *Boschniakia Rossica* in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats

Piao XX, Huang HG, Piao DM 2205

Distribution of dendritic cells and expression of chemokines in mouse models of mucosal immune *in vivo*

Xie ZJ, He YC, Jiao LM, Liu Y, Liu L 2210

Effects of celecoxib on cell proliferation and ERK2 expression of ERK2 in gastric cancer cells

Zhang Y, Jiang MD, Zeng WZ, Xu H, Xiong BJ, Weng M 2213

Growth inhibitory and apoptosis inducing effect on hepatocellular carcinoma Bel-7402 cell line by serum from rabbit fed with *Yiqi Huoxue Ruanjian Jiedu* decoction

Li DT, Shun GZ, Pei YX, Qi X, Li J, Ling HS 2217

Association of tumor necrosis factor- α and intercellular adhesion molecule-1 with acetaminophen-induced liver damages

Tian F, Wang Y, Wu ZY, Wang XQ, Li Y 2222

Expression of nerve growth factor messenger RNA in pancreatic cancer tissues in Sprague Dawley rats

Yang ZL, Deng XH, Yang LP, Li QL, Fan WT, Liang S, Miao XY 2227

REVIEW

Lactobacillus as a new living vaccine carrier in delivery of antigen

Yu QH, Yang Q 2231

Influence of nitric oxide and nitric oxide synthase on tumor radiotherapy sensitivity

Jiang CP, Ding YT 2235

Advance in effect of Id family gene on solid tumor in digestive system

Yang HY, Liu LX, Qu ZB, Liu GY, Chen W, Guo HX, Chen X 2238

Influential factors of Lamivudine associated YMDD variations of hepatic B virus

Lu DY, Wang S, Zhao LS 2243

Preventive methods for small-for-size liver syndrome in adult-to-adult living-donor liver transplantation

Ma YF, Li XC 2246

Advance in research of biological markers of hepato-cellular carcinoma

Wang JB, Liu LX 2251

Occurrence of inflammatory intestinal disease mediated by intestinal mucosal immunoregulation disturbance

Wang XD, Yuan XQ 2257

BRIEF REPORT

Effects of sp600125 on acetaldehyde-induced apoptosis of hepatic stellate cells and expression of Caspase-3 protein in rats

Tang W, Jiang MD, Li XA 2263

Effect of platelet activating factor on intestinal immunological barrier in young rat

Wang LJ, Liu DY, Sun M, Zhao X 2266

CLINICAL PRACTICE

Correlative factors of esophageal varices in patients with hepatocirrhosis: an analysis of 501 cases

Cui CJ, Jin YR, Piao XX, Pei FY 2269

Diagnosis and treatment for advanced hilar cholangiocarcinoma: an analysis of 15 cases

Zhang ZM, Xing HL, Li G, Liu K, Li G, Zhu JP, Su YM, Zhong H, Guo JX 2272

Changes of IgA and sIgA and its clinical significant in hepatic diseases

Liu DY, Liu P 2275

Clinical significance of detection for vascular endothelial growth factor in resection margin following total mesorectal excision

Zhan XL, Tian SL 2278

Effects of octreotide on platelet parameters in patients with acute pancreatitis

Huang J, Lu SQ, Chen JR 2281

Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica and Abstract Journals

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology Monthly

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date September 28, 2005

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wcjd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2005 by The WJG Press

改良聚合酶链反应检测 HBV 共价闭合环状 DNA

汤 勃, 王宇明, 刘 俊, 张 瑞

汤勃, 王宇明, 刘俊, 张瑞, 第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038

汤勃, 男, 1973-04-16生, 安徽省宣城市人, 汉族, 2003年第三军医大学博士, 主治医师, 主要从事肝炎病毒分子生物学研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30230320

通讯作者: 汤勃, 400038, 重庆市沙坪坝区西南医院感染科。

botang@mail.tmmu.com.cn

电话: 023-65461189-8044

收稿日期: 2005-07-19 接受日期: 2005-07-28

Detection of hepatitis B virus cccDNA with modified polymerase chain reaction

Bo Tang, Yu-Ming Wang, Jun Liu, Rui Zhang

Bo Tang, Yu-Ming Wang, Jun Liu, Rui Zhang, Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30230320

Correspondence to: Bo Tang, Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital of the Third Military Medical University, 400038, Chongqing, China. tobei@163.com

Received: 2005-07-19 Accepted: 2005-07-28

Abstract

AIM: To establish a simple and fast hepatitis B virus covalently closed circular DNA(cccDNA) detecting method based on polymerase chain reaction(PCR) with satisfactory sensitivity and specificity.

METHODS: The cccDNA and the relaxed circular DNA (rcDNA) were extracted from HepG2.2.15 cells and supernatant, respectively, and then purified. Two pairs of specific PCR primes were designed to cover the single strand area of rcDNA. And two pairs of non-specific PCR primes were designed to cover the double strand area of rcDNA. Before and after digested by single-strand-specific mung bean nuclease(MBN), cccDNA and rcDNA samples were amplified by specific primes and non-specific primes. Whether the digested cccDNA can be amplified by specific primes, without amplifying the digested rcDNA, was observed. The PCR parameters such as substrate amount and circulation times were changed during amplification. The HBV genome plasmid was used as control; and the HBV samples from patient with hepatitis B was used for practical test.

RESULTS: Different amounts of rcDNA template were

amplified by specific and non-specific primes. More than 10^4 and 10^2 rcDNA template molecules were amplified by two pairs of specific and non-specific primes, respectively. The specific primes could not discriminate between rcDNA and cccDNA when the template molecules were overabundant. Before and after the digestion by MBN, different amounts of cccDNA were amplified by specific and non-specific primes; and after the digestion, rcDNA templates were amplified by non-specific primes, but not by specific primes. With this strategy, we found the virus samples from the serum of the patient with chronic hepatitis B contained mainly rcDNA and a small quantity of cccDNA, while the samples from hepatocytes contained mainly cccDNA.

CONCLUSION: The combination of MBN selective digestion and specific PCR amplification of the cccDNA is a simple, fast, sensitive and specific method for the detection of HBV cccDNA.

Key Words: Hepatitis B virus; Covalently closed circular DNA; Polymerase chain reaction; Mung bean nuclease

Tang B, Wang YM, Liu J, Zhang R. Detection of hepatitis B virus cccDNA with modified polymerase chain reaction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(18):2188-2192

摘要

目的: 建立一种基于聚合酶链反应(PCR) 的简便快速、具有较高敏感性和特异性的检测乙型肝炎病毒(HBV)共价闭合环状DNA(cccDNA)的方法。

方法: 分别提取HepG2.2.15细胞内的cccDNA及培养上清中的松弛环DNA(rcDNA)样品, 试剂盒纯化; 设计2对特异性引物, 其扩增区域跨越rcDNA单链区; 设计2对非特异性引物, 扩增区域位于rcDNA双链区。经单链特异性绿豆芽核酸酶(MBN)分别消化cccDNA及rcDNA样品; 以特异性引物和非特异性引物对消化前后的两种样品分别进行PCR扩增, 并改变PCR扩增参数如底物数量、循环次数等, 观察特异性引物能否顺利扩增消化后的cccDNA, 同时又不扩增消化后的rcDNA。HBV基因组质粒样品作为对照。此外还采用实际乙型肝炎患者体内病毒样本检验此策略的实用性。

结果: 分别以非特异性引物和特异性引物扩增不同模

板数的HBV rcDNA样品, 2对非特异性引物可扩增出模板数在 10^2 以上的HBV rcDNA样品, 2对cccDNA特异性引物也可以扩增出模板数在 10^4 以上的样品. 特异性引物在PCR反应模板数较多时将不能区分消化前的rcDNA和cccDNA. 不同数量HBV cccDNA和rcDNA模板在MBN消化前后, 分别应用非特异性引物和特异性引物进行PCR扩增, 发现不同数量的cccDNA模板分子经过MBN消化后, 仍可用特异性引物和非特异性引物扩增出相应条带; rcDNA样品经过MBN消化后, 非特异性引物可扩增出产物条带, 而特异性引物无法扩增出条带. 采用此种策略, 我们发现慢性乙型肝炎血清HBV核酸样品主要成份为rcDNA, 并带有少量cccDNA, 而肝细胞内HBV核酸样品富含cccDNA, 与实际情况一致.

结论: 联合应用MBN选择性消化和cccDNA特异性引物的PCR检测法简便快速, 敏感性和特异性均较满意.

关键词: 肝炎病毒, 乙型; 共价闭合环状DNA; 聚合酶链反应; 绿豆芽核酸酶

汤勃, 王宇明, 刘俊, 张瑞. 改良聚合酶链反应检测HBV共价闭合环状DNA. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2188-2192
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2188.asp>

0 引言

HBV感染肝细胞的标志是HBV复制中间体, 包括共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)、单链DNA(single-stranded DNA, ssDNA)以及HBV mRNA^[1]. 通常cccDNA检测方法为Southern印迹杂交, 步骤繁琐, 检测周期长达3-4 d; 放射性标记探针可能造成环境污染和健康损伤, 而非放射性标记探针敏感性又较差. 因此1996年Kock *et al*^[2]设计特异性引物, 以PCR方法检测cccDNA取得成功, 并被广泛应用^[3-5]. 然而, 正如作者所提到的那样, 这种方法在PCR反应模板较多的情况下, 其特异性难以保证. 绿豆芽核酸酶(mung bean nuclease, MBN; 也称曲霉核酸酶S1)以内切酶形式非特异性地降解核酸为核苷酸^[6], 其中对于单链核酸的水解活性较双链核酸高30 000倍. 因此在合适的浓度和时间下, MBN可以切断HBV rcDNA而同时保持cccDNA的完整性. 根据上述原理, 我们改良了Kock *et al*的方法, 加入了MBN消化步骤, 提高了PCR反应的特异性.

1 材料和方法

1.1 材料 PCR试剂盒、绿豆芽核酸酶为美国Promega公司产品; 荧光定量PCR仪为德国Roche LightCycler, HBV核酸定量检测试剂盒为深圳匹基公司产品; 病毒核酸提取试剂盒、PCR产物纯化试剂盒为美国

Clontech公司产品; 肝细胞分离系列试剂为美国Gibco公司产品. HBV全基因组质粒为全军感染病研究所自行构建. HepG2. 2. 15细胞为第三军医大学免疫教研室提供, 乙型肝炎患者肝组织来源于肝移植受体肝脏, 由第三军医大学第一附属医院肝胆外科提供.

1.2 方法^[7-9] 以胰酶消化培养HepG2. 2. 15细胞10 min, 收集细胞, 200 r/min离心3 min, 弃上清. PBS重悬, 彻底洗涤6次. Hirt法提取染色体外DNA: 加入细胞裂解液[5 g/L SDS, 10 mmol/L Tris.Cl (pH8.0), 10 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA] 200 μ L, 振荡混合30 s, 37℃水浴过夜, 加入5 mol/L NaCl(终浓度1 mol/L) 50 μ L, 4℃静置12 h, 28 000 g、4℃离心50 min, 弃沉淀(含细胞染色体), 以PCR产物纯化试剂盒从上清中浓缩HBV cccDNA, 按试剂盒说明书进行, 核酸样品溶解于去离子水100 μ L. 以荧光定量PCR法检测样品5 μ L, 计算出HBV核酸样品总拷贝数. 在50 mL高速离心管中加入300 g/L蔗糖溶液25 mL; 收集HepG2. 2. 15细胞培养上清, 0.22 μ m过滤去除死亡细胞及残片, 取过滤液15 mL缓慢加在蔗糖溶液垫上, 230 000 g、4℃离心18 h, 弃上清, DNA酶I(DNase I)反应缓冲液200 μ L溶解沉淀, 加入DNase I 10U消化60 min(完全降解死亡细胞释出的cccDNA), 以病毒核酸提取试剂盒提取HBV颗粒内部未被消化的rcDNA, 按试剂盒说明书进行, 核酸样品溶解于去离子水100 μ L中. 以荧光定量PCR法检测样品5 μ L, 计算出HBV核酸样品总拷贝数. 收集1位慢性乙型肝炎患者血清, 荧光定量PCR法确定含有高拷贝数的HBV DNA后, 使用病毒核酸提取试剂盒提取HBV核酸, 按试剂盒说明书进行, 核酸样品溶解于去离子水100 μ L中; 肝细胞内HBV核酸样品: 以两步灌注法从肝移植后受体肝组织(约1 g)中分离肝细胞, PBS重悬, 彻底洗涤6次, 此后步骤同HBV cccDNA样品制备. HBV基因组从第1821核苷酸位截断后插入质粒, 常规提取纯化, 溶解于去离子水100 μ L中. 以荧光定量PCR法检测样品5 μ L, 计算出HBV核酸样品总拷贝数. 取10 \times 缓冲液1 μ L, 分别加入数量不等的HBV核酸模板及0.5U MBN, 去离子水补足体积至10 μ L, 置于PCR仪内37℃孵育5 min, 立即置于冰水浴中, 加入1 mol/L Tris(pH8.0)2 μ L中止反应. 所有引物均由上海生工生物工程有限公司合成, PAGE纯化. cccDNA特异性引物包括2对引物: CCC1A(正链引物)5'-CCTCTGCCGATCCATCTGCGGAAC-3' (1255-1279, 25 bp), CCC1B(负链引物)5'-CTGCGAGGCGAGGGAGTTCTTCTTC-3' (2376-2400, 25 bp); 反应条件为95℃ 40 s, 72℃ 3 min, 35个循环, 72℃延伸5 min. CCC2A(正链引物)5'-CTGAATCCCGCGGACGACCC-3' (1441-1460, 21 bp), CCC2B(负链引物)5'-ACCCAAGGCACAGCTTGAGG-3'

(1867-1889, 23 bp); 反应条件为95℃ 40 s, 67℃ 40 s, 72℃ 1 min, 35个循环, 72℃延伸5 min. HBV DNA非特异性引物包括2对引物: RC1A(正链引物)5' -TGTGTCTGCGGCGTTTATC-3' (378-397, 20 bp), RC1B(负链引物)5' -GTTTAAATGTATACCCAGAGAC-3' (816-837, 22 bp); 反应条件为95℃ 45 s, 54℃ 40 s, 72℃ 1 min, 35个循环, 72℃延伸5 min; RC2A(正链引物)5' -ACTGTTCAAGCCTCCAAGCT-3' (1859-1878, 20 bp), RC2B(负链引物)5' -AGTGCGAATCCACACTC-3' (2268-2284, 17 bp), 反应条件为95℃ 45 s, 51℃ 40 s, 72℃ 1 min, 35个循环, 72℃延伸5 min. 2对cccDNA特异性引物跨越HBV基因组(rcDNA)单链区和3链区(这两区均对MBN的消化作用敏感), 如果被切开, 则特异性引物将不能扩增此种线性模板; 2对非特异性引物则分别处于P区和前C/C区, 无论完整的cccDNA、rcDNA或是被切开的rcDNA均可顺利扩增. 各引物位置及MBN作用位点见图1 A, B.

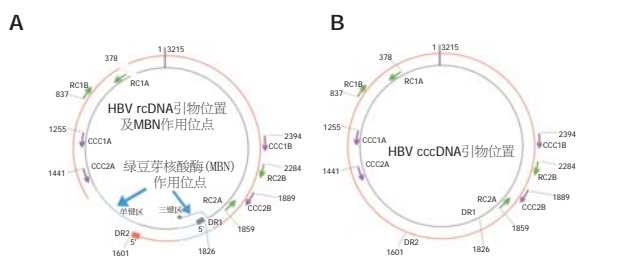


图1 HBV rcDNA、cccDNA、引物位置及MBN作用位点. A: HBV rcDNA正链为不完整外环, 负链为完整内环 B: HBV cccDNA内外环均完整, 无MBN作用位点. MBN切割位点单链区和三链区以粗箭头和虚线表示; cccDNA特异性引物为单箭头, CCC1A/CCC1B和CCC2A/CCC2B分别为2对引物; 非特异性引物为双箭头, RC1A/RC1B和RC2A/RC2B分别为2对引物. DR1: 直接重复序列1; DR2: 直接重复序列2.

2 结果

2对非特异性引物可扩增出模板数在 10^2 以上的HBV rcDNA样品(图2); 而对于同样的rcDNA模板, 2对cccDNA特异性引物也可以扩增出模板数在 10^4 以上的样品(图3). 由此可知, 特异性引物的“特异性”是相对的, 在PCR反应模板数较多时将不能区分rcDNA和

cccDNA. 此结果和Kock *et al*的一致. HBV全基因组质粒是在第1 821核苷酸位切开后插入质粒, 因此P区引物RC1A/RC1B可以扩增出模板数在 10^2 以上的样品, 而2对特异性引物在任何模板数下均不能扩增出目标条带(图2, 3). 不同数量HBV cccDNA和rcDNA模板在MBN消化前后, 分别应用非特异性引物RC1A/RC1B和特异性引物CCC1A/CCC1B进行PCR扩增, 从 10^5 - 10^2 不同数量的cccDNA模板分子经过MBN消化后, 仍可用特异性引物CCC1A/CCC1B和非特异性引物RC1A/RC1B扩增出相应条带, 惟亮度较未经消化的模板有不同程度的降低, 表明过量的MBN降解了部分cccDNA分子. 见图4垂直虚线左半部分. 而rcDNA样品经过MBN消化后, 如果模板数 $>10^3$, 则非特异性引物RC1A / RC1B可扩增出产物条带, 亮度较未经消化的模板为低; 对于cccDNA特异性引物CCC1A/CCC1B, 模板数即使为 10^5 , 经MBN消化后亦无法扩增任何相应条带. 见图4垂直虚线右半部分.

将血清和肝细胞内HBV核酸样品分别按1:1, 1:10, 1:100去离子水稀释, 各取5 μ L进行MBN消化和PCR扩增. 血清HBV核酸样品不稀释时, MBN消化前后均可扩增出cccDNA特异性条带; 10倍稀释样品消化前可见条带, 消化后无特异性条带; 100倍稀释样品无论是否消化, 均不能扩增出相应条带. 提示血清HBV核酸样品主要成份为rcDNA, 并带有少量cccDNA. 而富含cccDNA的肝细胞内HBV核酸样品即使在100倍稀释后, MBN消化也未能完全阻止PCR阳性条带的出现.

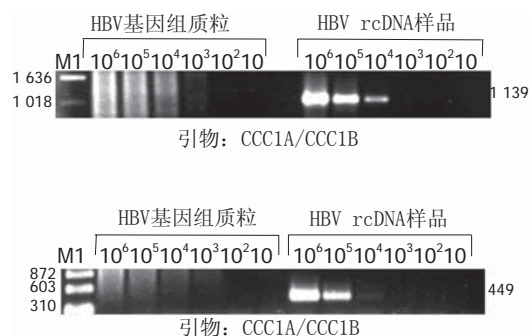


图3 特异性引物CCC1A/CCC1B和CCC2A/CCC2B分别扩增不同数量的HBV rcDNA及HBV基因组质粒模板电泳图. M1: 1kb DNA ladder; M2: Φ X174 DNA/HAE III相对分子质量标准; 10^6 - 10^2 : PCR体系中分别加入 10^6 - 10^2 个模板分子.

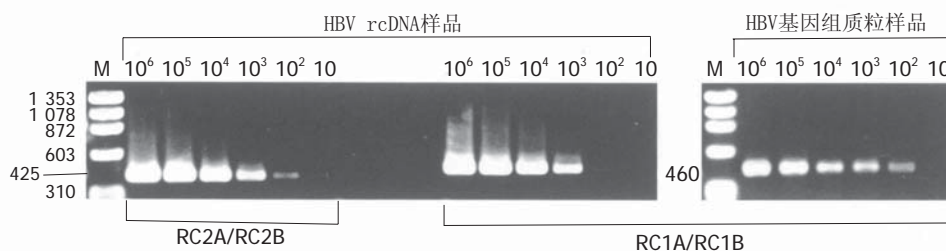


图2 非特异性引物RC2A/RC2B和RC1A/RC1B分别扩增不同数量的HBV rcDNA及HBV基因组质粒模板电泳图. M: Φ X174 DNA/Hae III相对分子质量标准; 10^6 - 10^2 : PCR体系中分别加入 10^6 - 10^2 个模板分子.

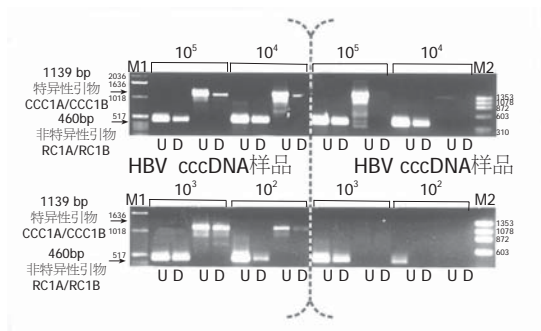


图4 不同数量HBV cccDNA和rcDNA模板经MBN消化后以非特异性引物RC1A/RC1B和特异性引物CCC1A/CCC1B进行PCR扩增后电泳图. 垂直黑色虚线左半部分为HBV cccDNA模板样品, 数量为 10^5 – 10^2 ; 垂直黑色虚线右半部分为HBV rcDNA模板样品, 数量为 10^5 – 10^2 . M1: 1kb DNA ladder; M2: Φ X174 DNA/HAE III相对分子质量标准; U: 未经MBN消化的样品; D: 经过MBN消化的样品.

3 讨论

HBV入侵靶细胞后, 其病毒复制周期的第一步即为松弛环型基因组(rcDNA)转变为共价闭合环状形式(cccDNA), 然后以此为模板转录出数种HBV mRNA^[10]. 同时cccDNA继续在细胞核内累积, 形成一个稳定的cccDNA池. cccDNA的存在和数量不仅是HBV感染靶细胞的特征性标志, 也是抗HBV药物疗效的重要指标^[11–16]. 近年来国内外研究者试图以PCR法代替传统Southern杂交检测cccDNA, 主要原理均为利用rcDNA为不完整双环, 设计跨越单链区和三链区的引物而达到只扩增完整cccDNA的目的^[17–20](图1). 然而, 正如Kock *et al*和我们的实验结果表明的那样, 单纯使用此种引物, 在PCR模板数量超过 10^4 时, 其扩增的选择性即不存在(图2, 3), 主要原因可能是负链引物引导的新生链有时能够克服三链区及末端蛋白的阻碍而继续延伸^[2]. 故若能切断rcDNA的单链区而保持cccDNA的完整, 则可以保证特异性引物选择性扩增的可靠性^[21, 22].

MBN是单链核酸水解酶, 可利用MBN切断HBV rcDNA单链区和(或)三链区, 使rcDNA线性化, 从而不能被跨越此区域的特异性引物所扩增. 相反, cccDNA则可以抵抗MBN的消化而保持完整双环, 继续作为PCR模板而被选择性扩增. 实验中我们发现, 10^5 个rcDNA分子经MBN处理后, 特异性引物不能扩增任何产物. 本科室构建的HBV基因组质粒是在HBV基因组第1821位核苷酸切开后单拷贝插入质粒, 因此理论上同样不能被cccDNA特异性引物扩增出相应条带, 图3显示的实验结果表明的确如此. 而另一方面, 低至100个cccDNA分子则因抵抗了MBN消化, 得以通过特异性引物扩增(图4).

一般认为, 慢性乙型肝炎患者血清内HBV核酸主要为Dane颗粒中的rcDNA, 同时可能包含少量由于肝细胞坏死释放的cccDNA; 而乙型肝炎患者肝细胞内的HBV核酸主要为cccDNA^[23–25], 我们提取这两种来源的核酸, 系列稀释后进行MBN消化前后的特异性引物PCR扩增, 验证本方法的临床实用性^[26, 27]. 结果表

明, 不加稀释的血清HBV核酸样品经消化、PCR扩增后可见cccDNA条带, 同样处理的10倍或者100倍稀释样品后则不可见cccDNA条带. 相反, 肝细胞内来源的HBV核酸即使稀释100倍, 仍可以抵抗MBN消化而出现cccDNA特异性条带. 这一结果符合理论预测和临床实际^[28]. 实验所用的HBV rcDNA和cccDNA样品分别提取自HepG2. 2. 15细胞株培养上清和细胞内. rcDNA样品提取过程中, 先过滤、纯化HBV Dane颗粒, 再以过量的DNase I完全降解Dane颗粒外可能存在的DNA, 最后提取Dane颗粒内的HBV基因组核酸应为较纯净的rcDNA^[27]. cccDNA样品的纯净则得益于如下措施: 胰酶化促使黏附于细胞表面的HBV颗粒脱离; PBS洗涤6次; 裂解细胞时没有按常规加入蛋白酶K, 使rcDNA保持在核衣壳内而没有随细胞染色体外HBV cccDNA一道被提取. MBN消化反应条件的优化极为重要. 虽然MBN对于单链核酸的活性较双链核酸高约30 000倍, 若酶的浓度 >14 MU/g模板DNA, MBN同样可以在双链DNA上造成缺口并降解. 用于MBN消化的HBV核酸分子均为pg数量级(1 pg HBV核酸 $\approx 10^5$ 个HBV基因组分子)^[17, 29, 30], 因此即使每次消化反应使用0.5 U的MBN也是绝对过量的, 正如实验中所看到的那样, 各种数量的样品经MBN消化后, 所有引物扩增的PCR条带亮度均有不同程度的降低, 提示模板数量减少. 我们经过多次实验, 确定 $10 \mu\text{L}$ 消化体系内加入0.5 U酶、孵育5 min后立即中止反应可以避免cccDNA分子的完全降解.

总之, 我们改良的这种HBV cccDNA PCR检测法简便易行, 从样品提取到获得电泳照片只需6 h, 同时联合了PCR法的敏感性和MBN消化的选择性, 敏感性和特异性均较好. 主要缺点在于各公司出品的MBN之间不完全一致, MBN消化不当所致的假阴性率和PCR反应的假阳性率较高, 需要预先优化反应条件. 若用我们已反复优化的方法, 可望获得较满意效果.

4 参考文献

- Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:51–68
- Kock J, Theilmann L, Galle P, Schlicht HJ. Hepatitis B virus nucleic acids associated with human peripheral blood mononuclear cells do not originate from replicating virus. *Hepatology* 1996;23:405–413
- Kock J, Baumert TF, Delaney WE, Blum HE, von, Weizsacker F. Inhibitory effect of adefovir and lamivudine on the initiation of hepatitis B virus infection in primary tupaia hepatocytes. *Hepatology* 2003;38:1410–1418
- Pancholi P, Lee DH, Liu Q, Tackney C, Taylor P, Perkus M, Andrus L, Brotman B, Prince, A. M. DNA prime/canarypox boost-based immunotherapy of chronic hepatitis B virus infection in a chimpanzee. *Hepatology* 2001;33:448–454
- De, Meyer S, Gong ZJ, Hertogs K, Depla E, van Pelt, J. F, Roskams T, Maertens G, Yap SH. Influence of the administration of human annexin V on in vitro binding of small hepatitis B surface antigen to human and to rat hepatocytes and on in vitro hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 2000;7:104–114
- de Castro, C. S, Souza de JR, Junior CB. The binding of zinc (II)

- to a double-stranded oligodeoxyribonucleotide. A voltammetric study. *Biophys Chem* 2004;112:59-67
- 7 Sells MA, Zelent AZ, Shvartsman M, Acs G. Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions. *J Virol* 1988;62:2836-2844
- 8 Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:1005-1009
- 9 Hirt B. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol* 1967;26:365-369
- 10 Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res* 2004;106:199-209
- 11 Hewlett G, Hallenberger S, Rubsamen-Waigmann H. Antivirals against DNA viruses (hepatitis B and the herpes viruses). *Curr Opin Pharmacol* 2004;4:453-464
- 12 Sung JJ, Wong ML, Bowden S, Liew CT, Hui AY, Wong VW, Leung NW, Locarnini S, Chan HL. Intrahepatic hepatitis B virus covalently closed circular DNA can be a predictor of sustained response to therapy. *Gastroenterology* 2005;128:1890-1897
- 13 Maynard M, Parvaz P, Durantel S, Chevallier M, Chevallier P, Lot M, Trepo C, Zoulim F. Sustained HBs seroconversion during lamivudine and adefovir dipivoxil combination therapy for lamivudine failure. *J Hepatol* 2005;42:279-281
- 14 Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, Wursthorn K, Petersen J, Lau G, Trepo C, Marcellin P, Goodman Z, Delaney WE, Xiong S, Brosgart CL, Chen SS, Gibbs CS, Zoulim F. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 2004;126:1750-1758
- 15 Chen Y, Sze J, He ML. HBV cccDNA in patients' sera as an indicator for HBV reactivation and an early signal of liver damage. 2004;10:82-85
- 16 Zoulim F, Berthillon P, Guerhier FL, Seigneres B, Germon S, Pichoud C, Cheng YC, Trepo C. Animal models for the study of HBV infection and the evaluation of new anti-HBV strategies. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17 Suppl:S460-S463
- 17 Bowden S, Jackson K, Littlejohn M, Locarnini S. Quantification of HBV covalently closed circular DNA from liver tissue by real-time PCR. *Methods Mol Med* 2004;95:41-50
- 18 Liu MC, Yu M, Zhang NL, Gong WB, Wang Y, Piao WH, Wang QH, Wang GQ. Dynamic analysis of hepatitis B virus DNA and its antigens in 2.2.15 cells. *J Viral Hepat* 2004;11:124-129
- 19 Zhang YY, Zhang BH, Theele D, Litwin S, Toll E, Summers J. Single-cell analysis of covalently closed circular DNA copy numbers in a hepadnavirus-infected liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:12372-12377
- 20 Jun-Bin S, Zhi C, Wei-Qin N, Jun FA. quantitative method to detect HBV cccDNA by chimeric primer and real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2003;112:45-52
- 21 He ML, Wu J, Chen Y, Lin MC, Lau GK, Kung HF. A new and sensitive method for the quantification of HBV cccDNA by real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295:1102-1107
- 22 Addison WR, Wong WW, Fischer KP, Tyrrell DL. A quantitative competitive PCR assay for the covalently closed circular form of the duck hepatitis B virus. *Antiviral Res* 2000;48:27-37
- 23 Ling R, and Harrison TJ. Production of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in transfected cells is independent of surface antigen synthesis. *J Gen Virol* 1997;78:1463-1467
- 24 Leung N. Treatment of chronic hepatitis B: case selection and duration of therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:409-414
- 25 Thermet A, Rollier C, Zoulim F, Trepo C, Cova L. Progress in DNA vaccine for prophylaxis and therapy of hepatitis B. *Vaccine* 2003;21:659-662
- 26 Yuen MF, Wong DK, Sablon E, Tse E, Ng IO, Yuan HJ, Siu, C.W, Sander TJ, Bourne EJ, Hall JG, Condreay LD, Lai CL. HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B in the Chinese: virological, histological, and clinical aspects. *Hepatology* 2004;39:1694-1701
- 27 Wieland SF, Spangenberg HC, Thimme R, Purcell RH, Chisari FV. Expansion and contraction of the hepatitis B virus transcriptional template in infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:2129-2134
- 28 Spangenberg HC, Thimme R, Blum HE. Tracking cccDNA in chronic HBV infection. *Hepatology* 2004;39:1736-1738
- 29 Wong DK, Yuen MF, Yuan H, Sum SS, Hui CK, Hall J, Lai CL. Quantitation of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients. *Hepatology* 2004;40:727-737
- 30 Yuen MF, Wong DK, Sum SS, Yuan HJ, Yuen JC, Chan AO, Wong BC, Lai CL. Effect of lamivudine therapy on the serum covalently closed-circular (ccc) DNA of chronic hepatitis B infection. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1099-1103

电编 李琪 编辑 潘伯荣 审读 张海宁