

抗病毒药物对乙型肝炎病毒cccDNA水平的影响

钱峰, 李明, 朱传武

钱峰, 李明, 朱传武, 苏州市第五人民医院肝病科 江苏省苏州市 215007

朱传武, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事病毒性肝炎的临床免疫学和分子生物学的研究。

作者贡献分布: 本文文献检索、撰写由钱峰与李明完成; 文章选题、指导、修改及审校由朱传武完成。

通讯作者: 朱传武, 教授, 主任医师, 博士生导师, 215007, 江苏省苏州市西二路2号, 苏州市第五人民医院肝病科。
zhuchw@126.com

电话: 0512-65180193 传真: 021-65291020

收稿日期: 2015-04-13 修回日期: 2015-04-24

接受日期: 2015-05-07 在线出版日期: 2015-08-08

Impact of antiviral agents on levels of hepatitis B virus covalently closed circular DNA

Feng Qian, Ming Li, Chuan-Wu Zhu

Feng Qian, Ming Li, Chuan-Wu Zhu, Department of Hepatology, the Fifth People's Hospital of Suzhou, Suzhou 215007, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Chuan-Wu Zhu, Professor, Chief Physician, Department of Hepatology, the Fifth People's Hospital of Suzhou, 2 Xier Road, Suzhou 215007, Jiangsu Province, China. zhuchw@126.com

Received: 2015-04-13 Revised: 2015-04-24

Accepted: 2015-05-07 Published online: 2015-08-08

Abstract

Chronic hepatitis caused by hepatitis B virus (HBV) infection remains an incurable disease at present, which is mainly because the approved antiviral agents, such as interferon- α and nucleos(t)ide analogues, cannot effectively eradicate intrahepatic hepatitis B virus covalently closed circular DNA (cccDNA). And thus a suboptimal efficacy of antiviral agents and relapse after therapy occur very commonly. Therefore, novel drugs and treatment strategies

remain to be developed on the basis of further theoretical and clinical research of HBV infection to achieve the ultimate goal of eradication of HBV cccDNA in the future. In this paper, we discuss multiple agents and therapeutic regimens influencing cccDNA levels, in order to help clinicians comprehensively understand the present situation in the research of the clearance of HBV cccDNA.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Antiviral agent; Impact; Hepatitis B virus; Covalently closed circular DNA

Qian F, Li M, Zhu CW. Impact of antiviral agents on levels of hepatitis B virus covalently closed circular DNA. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(22): 3495-3504
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/3495.aspx>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i22.3495>

摘要

慢性乙型肝炎目前还是不能治愈的疾病, 主要原因是由于干扰素和核苷(酸)类似物等抗病毒药物不能有效清除肝细胞内乙型肝炎病毒共价闭环状DNA(hepatitis B virus covalently closed circular DNA, HBV cccDNA), 导致药物疗效不佳或治疗后复发。因此, 进一步加强对HBV感染的基础和临床研究, 以清除肝细胞内HBV cccDNA为目标开发新药和探讨治疗策略是今后肝病研究领域的重要课题。本文从细胞、动物和临床研究水平, 将近年来开展的影响HBV cccDNA水平的多种药物和治疗方案进行综述, 旨在为临床医师较为全面地了解清除HBV cccDNA的研究现状提供参考。

背景资料

慢性乙型肝炎经久不愈, 目前尚缺乏特异有效的根治办法, 主要是因为乙型肝炎病毒共价闭环状DNA(hepatitis B virus covalently closed circular DNA, HBV cccDNA)在肝细胞内长期存在, 目前的抗病毒药物, 不论是干扰素(interferon, IFN)还是核苷(酸)类似物, 均不能有效清除cccDNA, 导致抗病毒药物疗效有限, 或者发生停药后复发。

同行评议者

陈泽雄, 主任医师, 中山大学附属第一医院中医科

■ 研发前沿

现有的抗病毒药物难以治愈慢性HBV感染, 了解近年来在抑制HBV cccDNA方面开展的工作, 加强基础和临床研究, 开发多靶点、多靶点的抗病毒新药, 探索更加有效的治疗策略, 是目前肝脏病学领域的重要课题。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 抗病毒药物; 影响; 乙型肝炎病毒; 共价闭环环状DNA

核心提示: 本文对国内外肝病学界近年来在细胞、动物和临床方面围绕清除肝细胞核内乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)共价闭环环状DNA(covalently closed circular DNA)开展的工作进行了比较全面的综述, 为临床医师了解根治HBV感染的研究现状提供参考。

钱峰, 李明, 朱传武. 抗病毒药物对乙型肝炎病毒cccDNA水平的影响. 世界华人消化杂志 2015; 23(22): 3495-3504 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/3495.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i22.3495>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染人体后进入肝细胞, 在细胞质中脱去核壳, 形成HBV部分双链松弛环状DNA(relaxed circular DNA, rcDNA)分子。随后HBV rcDNA进入细胞核中, 由宿主DNA聚合酶进行DNA修复, 进而在拓扑异构酶的作用下形成具有超螺旋结构的共价闭环环状DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)分子。HBV cccDNA是病毒前基因组RNA(pregenome RNA, pgRNA)转录的原始模板, 是建立HBV感染状态和维持病毒反复复制的分子基础。成人感染HBV后绝大部分(90%-95%)呈急性自限性过程, 宿主在清除血液中完整病毒颗粒、肝细胞内HBV rcDNA的同时, 也清除了HBV cccDNA, 患者因而获得了临床痊愈。而在慢性HBV感染过程中, 即使在有效抗病毒药物治疗下, 患者获得了血清HBV DNA抑制, 甚至获得了HBeAg血清学转换, 但停药以后病毒复发的现象非常常见^[1-3]。其主要原因是由于肝细胞核内的HBV cccDNA以微型染色体形式存在, 非常稳定, 难以被清除。因此, 抗病毒治疗需以清除肝细胞核内的HBV cccDNA为终极目标^[4], 只有这样才能彻底治愈乙型肝炎。近年来, 随着国内外肝病学界进一步加强对慢性HBV感染的研究, 大家对根治慢性乙型肝炎的愿望愈来愈强烈。本文从细胞、动物和临床研究水平就抗病毒药物对HBV cccDNA的影响作一述评, 以期为临床医师了解清除HBV cccDNA的研究现状提供参考。

1 影响HBV cccDNA的细胞水平研究

1.1 干扰素对HBV cccDNA的影响 干扰素- α (interferon alpha, IFN- α)是慢性乙型肝炎抗病毒治疗的重要药物之一, 其具有免疫促进作用, 同时也有一定的直接抗病毒活性, 因此具有双重抗病毒作用。目前普遍认为IFN- α 对HBV cccDNA不具有直接的作用。Lucifora等^[5]以IFN- α 处理HBV感染的dHepaRG细胞, 发现随IFN- α 处理时间的延长, dHepaRG细胞内cccDNA的水平显著下降, 在IFN- α 处理10 d后, 细胞内cccDNA下降了80%。他们用IFN- α 处理HBV感染的原代人肝细胞后也获得了同样的效应。进一步研究发现, IFN- α 能促进原代人肝细胞上载脂蛋白B mRNA编辑酶催化多肽样3A(apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3A, APOBEC3A)的表达。APOBEC3A是APOBEC3家族的一员, 是一种DNA胞苷脱氨酶, 通过胞苷的广泛脱氨基作用引起外源DNA的破坏, 因而具有抗病毒效应^[6,7]。在本研究中, IFN- α 诱导的细胞cccDNA下降, 在处理后的观察期间其效应是持续的, 没有出现cccDNA反弹的现象。因此, APOBEC3A表达的增加可能是IFN- α 降解cccDNA的一种机制, 而且这种作用对宿主细胞DNA不产生影响。在慢性乙型肝炎抗病毒治疗中, Lucifora等^[5]的研究为我们重新认识和利用IFN的作用提供了新的探索空间。

抑制HBV cccDNA的转录也是根治HBV感染的重要一环。Belloni等^[8]用IFN- α 处理HepG2细胞后, HBV复制受到抑制, 发现其原因是由于cccDNA转录pgRNA和亚基因组RNA(PreS/S RNAs等)受到了抑制。在感染HBV的人原代肝细胞uPA/SCID小鼠活体研究中, IFN- α 处理后小鼠体内HBV水平显著下降, pgRNA和亚基因组RNAs也显著受到抑制。研究发现其机制是IFN- α 使多梳抑制复合体2(polycomb repressive complex 2, PRC2)的一些辅助抑制因子和成分获得持续补充, 引起与cccDNA结合的组蛋白尾端的一些特定赖氨酸残基发生去乙酰化或者发生甲基化, 导致cccDNA转录pgRNA和亚基因组RNAs显著下降。另外, IFN- α 也减少了转录因子STAT1和STAT2与cccDNA的结合。研究揭示, IFN- α 可以介导HBV cccDNA的转录抑制, 这有助于在分子机制上开发新的抗病毒治疗靶点。Liu等^[9]在

鸭HBV(duck HBV, DHBV)感染的鸡肝癌细胞系中, 也证实IFN- α 使与cccDNA结合的组蛋白上第9位和第27位赖氨酸乙酰化减少, 导致持久和显著的cccDNA转录抑制。另外, 在重组杆状病毒-HBV/HepG2细胞系培养中, IFN- γ 可以抑制HBV DNA的复制, 拉米夫定(lamivudine, LMV)与IFN- γ 联合处理没有增加额外的抑制效应, 但与LMV单独应用比较, 以LMV处理2 d后再序贯应用IFN- γ 处理6 d, HBV cccDNA池下降了72%。结果提示这种序贯处理具有一定的应用前景^[10]。

1.2 胞苷脱氨酶及其相关分子对HBV cccDNA的影响 Lucifora等^[5]在研究IFN- α 对HBV cccDNA影响的同时, 他们还研究了淋巴毒素- β 受体激活与cccDNA降解的关系。以淋巴毒素- β 受体激动剂处理HBV感染的dHepaRG细胞, 12 d以后dHepaRG细胞内cccDNA大约下降了90%。进一步研究揭示, 淋巴毒素- β 受体的激活显著上调了dHepaRG和原代人肝细胞表达APOBEC3B, 以及引起少量APOBEC3G的表达。淋巴毒素- β 受体激活以剂量依赖性方式诱导APOBEC3B的表达, 其表达的水平在连续处理期间稳定增加。在dHepaRG细胞中抑制APOBEC3B基因表达以后, cccDNA的脱氨基作用也随之减少。因此, 在淋巴毒素- β 受体激活后, 细胞产生的APOBEC3B胞苷脱氨酶起到了降解HBV cccDNA的作用^[11]。一项研究^[7]也显示, 在HBV持续携带者和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者中, APOBEC3B等位基因缺失的频率显著高于正常人, 表明APOBEC3B表达异常对乙型肝炎患者是不利的。

在DHBV的细胞研究中, 激活诱导胞苷脱氨酶(activation-induced cytidine deaminase, AID)的过度表达可以引起DHBV cccDNA链上C到U的转换, 导致cccDNA水平下降, 这主要依赖于尿嘧啶-DNA糖基化酶(uracil-DNA glycosylase, UNG)的作用。UNG是一个宿主核因子, 可以去除尿嘧啶化DNA链上的尿嘧啶碱基, 启动碱基切除修复(base excision repair, BER), 使DNA得到修复或剪切。因此, 通过胞苷脱氨基和尿嘧啶剪切的AID/UNG途径可以触发cccDNA的降解^[12]。

1.3 RNA干扰对HBV cccDNA的影响 RNA干扰技术为抗HBV治疗开辟了一个新的途径。Li等^[13,14]研究了HepG2.2.15细胞中针对HBV核

定位信号(nuclear localization signal, NLS)区的小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)的作用。发现siRNA显著抑制了HBV cccDNA的复制, 联合应用3种针对NLS区不同位点的siRNAs, 具有更强的抑制作用。结果提示, 以HBV NLS区作为siRNA的靶位具有抗HBV治疗的潜能。Xin等^[15]构建重组质粒psil-HBV并转染到HepG2.2.15细胞中, 同样发现联合应用siRNA具有显著的抗HBV效应, cccDNA的扩增得到显著抑制。在HepG2.2.15细胞中, 联合应用针对HBV cccDNA和X蛋白的siRNAs可以获得类似的cccDNA抑制效应^[16]。

与siRNA相比, 载体介导的短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)能够诱导持续的RNA干扰。Kim等^[17]构建2种针对HBx蛋白的shRNA(sh1580 and sh1685), 克隆到HIV质粒U6启动子的下游, 形成一个慢病毒载体。将含有shRNAs的慢病毒载体转染到HepAD38细胞中, 发现sh1580和sh1685对HBV cccDNA的抑制率分别达到19.7%和25.5%。研究提示, 针对HBx的shRNA能够有效降低HBV cccDNA的水平。

siRNA除了在转录后水平调节基因的表达以外, 也可以引起转录基因的沉默, 这主要是通过RNA干扰介导的异染色质形成和RNA指导的DNA甲基化(RNA-directed DNA methylation, RdDM)而实现的。Park等^[18]将针对HBx蛋白的shRNA用慢病毒载体转染到人肝癌细胞HepAD38中, 发现shRNA诱导的CpG甲基化显著高于对照组(31.3% vs 12.8%), 且在发生CpG甲基化的细胞克隆中有半数以上均定位于shRNA针对的目标序列附近。甲基化诱导的转录抑制在体外转录实验中也得到证实。因此, 通过对HBV cccDNA的修饰, 即通过RdDM作用, 可以实现对cccDNA的转录调节。

1.4 核酶及其他DNA切割酶对HBV cccDNA的影响 较早的研究^[19,20]表明, 锌指蛋白可以抑制单纯疱疹病毒和DHBV的转录。Cradick等^[21]设计了多对针对HBV cccDNA不同区域的锌指核酶(zinc-finger nucleases, ZFNs), 这些ZFNs含有序列非依赖性限制酶FokI的切割结构域, 并且与锌指蛋白结构域串联融合, 特异地结合新的DNA序列。将构建好的ZFNs载体与含有HBV基因组的质粒共转染到Huh7细胞中, 在培养3 d以后, 26%的靶质粒被切割为线性DNA, 10%的靶质粒被切割成尾尾相接的DNA, 这种尾尾相

■ 相关报道

本文对抗病毒药物在影响HBV cccDNA水平方面的研究做了比较全面和系统的介绍, 目前在此方面的相关报道主要涉及到一些具体的体外或体内研究。

■ 创新盘点

文章总结了近年来从基础到临床在抑制HBV cccDNA方面开展的研究, IFN和核苷(酸)类似物能够降低患者肝内cccDNA的水平, 但IFN具有直接降解cccDNA的作用; 胞苷脱氨酶、RNA干扰、核酶及其他DNA切割酶、一些小分子化合物等在降解和抑制cccDNA方面具有进一步的开发潜能, 现有抗病毒药物的治疗策略对cccDNA的影响也值得进一步研究。

接的连环体不能产生功能性的病毒, 线性DNA也无转录活性。研究结果首次表明, 应用针对HBV cccDNA的ZFNs对治疗慢性乙型肝炎具有开发研究的价值。Weber等^[22]最近设计了针对HBV基因组P、C和X基因区的3个ZFNs, 将这些HBV特异性的ZFNs与自我互补腺相关病毒(self-complementary adeno-associated virus, scAAV)构建成载体并转染到HepAD38细胞中, 以检验ZFNs的抗HBV活性。结果显示, 这些ZFNs有效地切割了HBV靶点, 其中针对P区的ZFN导致HBV DNA复制被完全抑制, 不能产生感染性病毒颗粒, 此种效应在1次处理后可以维持2 wk。3个ZFNs均具有高度的特异性, 通过高通量测序仅见微量的靶外切割。研究表明, HBV特异性ZFNs能够有效抑制HBV DNA和cccDNA的复制, 对根治HBV感染具有应用前景。

转录激活因子样效应核酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)是一种新开发的核酶, 能够切割序列特异性DNA靶位, 因此具有使HBV cccDNA失能的作用。Bloom等^[23]设计了针对HBV基因组S和C基因序列的TALENs, 发现在HepG2.2.15细胞中TALENs有效地切割了HBV cccDNA靶位, 抑制了病毒复制, 其中针对S基因的TALEN使cccDNA发生定性变异率达到35%。研究证明, 靶向核酶技术可以介导HBV cccDNA的裂解。在类似的研究中, 构建针对HBV DNA保守序列的TALENs, 发现在转染全长单股线性HBV DNA的Huh7细胞中, TALENs的表达显著降低了HBeAg、HBsAg、HBcAg和pgRNA的水平, cccDNA的水平也显著下降, 因此TALENs可以特异性地使HBV基因组失活。并且, TALENs使受到HBV抑制的IFN刺激应答元件指导的转录得到恢复, 与IFN- α 联合应用可以提高抗病毒效应^[24]。因此, 研究也提示TALENs与IFN- α 具有潜在的协同抗病毒效应。除了ZFNs和TALENs以外, CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/CRISPR-associated(Cas)系统是源自细菌和古生菌免疫系统的新的基因组编码工具, 为宿主抵抗外来病毒或质粒入侵提供保护^[25-27]。CRISPR/Cas9系统包含2个短RNAs和1个DNA核酸内切酶Cas9, 短RNAs复合体指引Cas9 DNA核酸内切酶切割目标DNA序列。Lin等^[28]设计了8个针对基因A型HBV的引导RNAs, 构

建了HBV特异性的CRISPR/Cas9系统。在转染了HBV表达载体的Huh7细胞中, 该系统显著降低了HBV核心和表面蛋白的产生。经过筛选, RNA P1和RNA XCp是所设计的8个引导RNAs中最为有效的, 其中针对HBV保守序列的引导RNA XCp可以作用于HBV的不同基因型。研究表明, CRISPR/Cas9系统能够降解HBV cccDNA, 具有根除HBV感染的潜能。

另外, Schiffer等^[29]以数学模型的方法设计了针对HBV cccDNA的切割酶, 其作用的过程也是将表达切割酶的基因导入病毒载体再转染到肝细胞中。模型模拟显示, 病毒载体进入靶细胞的效率高, 体液免疫只能有限清除病毒载体, 酶和DNA靶位具有很强的结合力, 因此对cccDNA的破坏水平很高。但是, 在DNA切割酶不能有效控制cccDNA复制的情况下, 切割酶的初始耐药可能会发生。模型预测显示, 如果针对cccDNA不同序列的多个切割酶联合应用, 或者将不同的切割酶序贯应用, 则可以预防产生多酶耐药。

1.5 其他研究 Cai等^[30]在85000多种化合物中筛选出2种结构相关的双取代磺胺类药物(disubstituted sulfonamides, DSS), 目前称为CCC-0975和CCC-0346。在细胞培养中以很低的浓度即开始起效, 证实他们具有作为cccDNA抑制剂的作用。进一步研究其作用机制, 发现DSS化合物既不直接抑制HBV DNA的复制, 也不降低病毒聚合酶的活性, 同时, 也不促进cccDNA和rcDNA在肝内的降解。其机制是干预rcDNA向cccDNA的转化, 最终导致HBV cccDNA及rcDNA水平降低。在鸭HBV感染的原代鸭肝细胞培养中, CCC-0975能够减少cccDNA的生物合成。这项研究首次证实了小分子化合物对HBV cccDNA的作用。因此, 作为根除HBV cccDNA的药物, DSS化合物具有进一步验证的价值。

在利用免疫细胞清除HBV cccDNA的研究方面, 有学者设计了针对HBV表面蛋白的嵌合型T细胞受体, 并用以表达在原代人T细胞上, 因此这种受体具有抗体的特异性。该受体包含一个针对HBV表面蛋白的单链抗体片段和共刺激CD28分子。当这种嵌合型受体以反转录方法导入并表达于细胞表面的时候, 能够使原代人T细胞识别产生HBsAg的肝细胞, 释放IFN- γ 和白介素-2, 导致HBV复制的肝细胞

溶解. 在与HBV感染的原代人肝细胞共同培养的过程中, 这种设计的抗原特异性T细胞能够选择性清除HBV感染的肝细胞, 并最终根除所有cccDNA阳性的靶细胞^[31]. 研究结果提示, 利用这种加工改造的T细胞进行过继免疫, 可能为清除HBV cccDNA提供一种新的治疗方法. 当然, T细胞治疗也会引起肝细胞损伤, 如果将来这种治疗方法得以进一步研究和开发, 尚需进行大量的临床前研究.

2 影响HBV cccDNA的动物水平研究

2.1 RNA干扰对HBV cccDNA的影响 在HBV转基因鼠模型的研究中, 实验结果显示siRNA显著抑制了HBV cccDNA的扩增, 对病毒复制和抗原表达具有较好的抑制效应^[32]. Li等^[33]设计了3个针对HBV不同位点的siRNAs, 在HBV转基因鼠的实验研究中发现3个siRNAs均有显著的抗病毒活性, siRNAs特异性地抑制HBsAg表达和HBV DNA复制, 并呈剂量依赖性关系. siRNAs联合应用比单独使用具有更强的病毒抑制效应, 联合使用后对鼠血清中HBsAg和HBeAg的抑制率均达到96%以上, 肝组织中HBsAg阳性细胞减少了91%, 病毒mRNA和DNA的抑制水平分别是对照组的90.0%和87.7%. 研究结果表明, 在HBV转基因鼠中, siRNA的应用可以干扰cccDNA的功能, 联合应用可以介导更强的病毒抑制作用.

2.2 核酶及其他DNA切割酶对HBV cccDNA的影响 Bloom等^[23]除了在细胞水平证实TALENs具有对HBV cccDNA的抑制效应以外, 在HBV复制的鼠模型活体研究中也同样发现TALENs对病毒复制的抑制作用. Lin等^[28]对CRISPR/Cas9系统在动物水平的抗病毒活性也进行了验证. 将HBV表达载体与CRISPR/Cas9双表达载体共同注射到C57BL/6系小鼠尾静脉中, 发现在注射HBV特异性引导RNA P1和RNA XCp以后, 小鼠血清HBsAg水平显著下降, 肝内HBV表达载体的水平也显著下降. 采用T7E1分析法进一步证实, 这种对靶序列的特异性切割是由CRISPR/Cas9系统完成的; 对注射引导RNA P1的小鼠取肝内HBV DNA进行克隆测序, 也证明HBV基因组的破坏是CRISPR/Cas9系统作用的结果. 研究提示, CRISPR/Cas9系统可以切割HBV基因组表达模板, 促进cccDNA的清除.

2.3 胞苷脱氨酶及其他研究 Kitamura等^[34]

在DHBV复制模型中研究了胞苷脱氨酶对cccDNA的作用. DHBV DNA测序分析表明, cccDNA中G到A或C到T的累积变异主要见于表达APOBEC3G的细胞, 并且在UNG被抑制后这种变异的增加更为显著. cccDNA的高变异在基因P区产生了很多终止密码, 抑制UNG也提高了APOBEC3G抑制病毒复制的作用. 在长期培养中, rcDNA、pgRNA和分泌性病毒颗粒相关的DNA水平均下降. 如果APOBEC3G的催化位点发生变异, 抑制UNG则不能提高APOBEC3G介导的病毒抑制作用. 转染研究表明, 既抑制UNG又促进APOBEC3G表达, 可以显著降低cccDNA的复制能力.

Menne等^[35]在土拨鼠肝炎模型中研究了小分子Toll样受体7(Toll-like receptor 7, TLR7)激动剂GS-9620对土拨鼠肝炎病毒(woodchuck hepatitis virus, WHV)的影响. 在对GS-9620的药代动力学、药效动力学和耐受性进行评估后, 给予WHV慢性感染的土拨鼠应用GS-9620或安慰剂处理4-8 wk. 结果显示, 在GS-9620处理后, 土拨鼠血清病毒DNA、肝脏WHV cccDNA和WHV RNA的水平获得了快速、显著和持续的下降, WHV表面抗原也消失, 其中血清病毒DNA下降的最大均值达到6.2 log10, 并且有一组动物在GS-9620处理后诱导了持续的表面抗体应答. HCC的发病率在安慰剂对照组是71%, 而在获得持续性病毒学应答的GS-9620处理组中, HCC的发病率仅为8%. 同时, GS-9620引起可逆性的血清肝脏酶学升高, 血小板减少, 诱导了肝内CD8⁺ T细胞, NK细胞、B细胞和IFN应答等免疫学反应. 因此, 该研究提示TLR7激动剂GS-9620在HBV感染患者中具有开发研究的价值.

另外, 在慢性HBV感染中, 免疫介导的细胞损伤和代偿性肝细胞再生有利于cccDNA的下降, 并选择出无cccDNA的肝细胞生长. 有学者研究了肝脏再生对活体内cccDNA稳定性和活性的影响. 使用uPA/SCID小鼠动物模型, 从高病毒血症的uPA/SCID嵌合型小鼠体内分离感染了绒毛猴HBV(woolly monkey HBV, WM-HBV)的原代树鼯肝细胞(primary tupaia hepatocytes, PTH), 将其移植到20只uPA受体鼠体内. 发现WM-HBV感染的肝细胞被移植到受体鼠以后, 细胞在80 d内平均增加了3.8倍, 病毒体(包括rcDNA和cccDNA)的产生减少了

应用要点

以目前抗病毒药物为基础, 探索更加优化的治疗策略, 进一步降低患者肝内HBV cccDNA的水平, 甚至在部分患者体内达到清除cccDNA的目标. 同时, 随着基础研究的深入, 为阻断HBV cccDNA的形成或转录开发多环节、多靶点的药物提供可能.

■名词解释

乙型肝炎病毒共价闭环状DNA (HBV cccDNA): 是嗜肝DNA病毒HBV基因组的复制中间体, 长期存在于肝细胞核中, 是病毒前基因组RNA和部分基因mRNA合成的原始模板, 在HBV复制过程中起关键作用, 其长期存在和复制是HBV慢性感染的最主要原因。

75%, 病毒pgRNA和HBcAg水平表达降低。特别是在PTH再生期间, 每个细胞cccDNA平均下降2 log值。分析其原因, 一方面是由于子代细胞cccDNA池被稀释, 另一方面是由于肝内cccDNA载量下降了0.5 log值。肝内病毒DNA在研究末期仍然持续存在, 最主要的原因还是由于cccDNA未被清除, 而不是由于存在整合型病毒。研究^[36]结果表明, 在肝脏再生过程中, 肝细胞分裂可以引起cccDNA池不稳定, 导致大多数感染病毒的肝细胞发生cccDNA清除。临床上, 部分慢性乙型肝炎患者在发病中伴随着肝细胞的坏死和再生, 在没有抗病毒的情况下, 或者在适时采用抗病毒药物治疗以后, 获得了HBsAg的消失或血清学转换, 也可能存在上述机制的作用。

3 影响HBV cccDNA的临床研究

3.1 核苷(酸)类似物单药治疗对HBV cccDNA的影响 Yuen等^[37]较早研究了LMV治疗对患者HBV cccDNA的影响。在LMV治疗1年期间, 82例患者血清HBV cccDNA在24 wk和52 wk分别下降了2.21 log₁₀和2.12 log₁₀拷贝/mL, 而安慰剂对照组仅分别下降0.31 log₁₀和0.2 log₁₀拷贝/mL。发生LMV耐药的患者cccDNA的下降显著低于无耐药患者。在一项包括LMV、阿德福韦酯(adeфовir dipivoxil, ADV)、恩替卡韦(entecavir, ETV)、替比夫定和克来夫定治疗的研究中, 124例患者接受了1年的抗病毒治疗, 肝内总HBV DNA下降2 log₁₀拷贝/细胞, cccDNA下降1 log₁₀拷贝/细胞, 其中5例患者cccDNA不可测出^[38]。对于抗病毒治疗获得病毒学应答的患者, 肝内cccDNA水平随着治疗时间的延长而进一步降低, 病毒学应答持续35 mo以上、血清抗-HBe阳性持续30 mo以上者, 有超过60%以上的病例肝内cccDNA水平低于检测下限^[39]。

在ETV 3期临床研究的部分患者中, 接受ETV治疗48 wk以后, 肝内HBV cccDNA下降1 log₁₀, 治疗后cccDNA是肝内HBV DNA存在的主要形式^[40], 因此也成为治疗后患者病毒复发的主要原因。类似的研究也显示, 在LMV治疗52 wk后肝内HBV DNA, 包括cccDNA均降低, 肝内cccDNA与总HBV DNA的比值较治疗前显著增加, 也提示cccDNA是治疗后肝内病毒存在的主要方式^[41]。有学者^[42]发现, 在ADV治疗12 wk以后, 患者肝内总HBV DNA和

cccDNA显著下降, 而随着病毒水平的降低, 患者也获得了抗病毒免疫的部分恢复。

抗病毒药物的强度对HBV cccDNA水平的影响也是令人关注的, 一项研究^[43]比较了ETV和ADV治疗对患者肝内cccDNA的影响。治疗48 wk时, 两组患者肝内cccDNA水平均轻度下降, 与安慰剂对照组比较均无统计学差异。但多因素回归分析提示, 治疗引起的cccDNA下降与肝脏Knodell坏死炎症程度和Ishak纤维化程度的改善密切相关。因此, 尽管ETV或者ADV治疗1年不足以根除cccDNA, 但通过长期抗病毒治疗在获得肝脏组织学改善以后, 则有利于抑制肝内cccDNA。

Ruan等^[44]比较了急性乙型肝炎和接受抗病毒治疗的慢性乙型肝炎患者肝内HBV cccDNA的变化。急性乙型肝炎患者肝内cccDNA的中位水平是0.002拷贝/细胞, 显著低于慢性乙型肝炎患者的水平。慢性乙型肝炎抗病毒治疗取得病毒学应答和HBsAg消失的患者肝内cccDNA的中位水平为0.012拷贝/细胞, 比原发性治疗失败的患者(4.18拷贝/细胞)显著为低, 但与仅获得病毒学应答患者比较无统计学差别(0.039拷贝/细胞)。进一步分析表明, 肝内cccDNA的水平与血清ALT、HBeAg和肝内总HBV DNA水平呈正相关关系, 而与血清HBV DNA和HBsAg水平无显著相关关系。该研究结果提示, 即使在急性乙型肝炎和抗病毒治疗取得HBsAg阴转的慢性乙型肝炎患者中, 肝内也仍然存在HBV cccDNA。最近的一项研究^[45]也得出类似的结果。在ETV治疗的120例HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者中, 有20例在治疗前后均进行了肝脏活检。治疗48 wk时, 肝内HBV cccDNA的中位水平从基线的 5.1×10^6 拷贝/mL降至 2.4×10^3 拷贝/mL, cccDNA虽有显著下降, 但均未被清除。

从总体上看, 在核苷(酸)类似物治疗48 wk时患者肝内cccDNA下降的程度是有限的, 要获得更好的疗效, 在不发生耐药的情况下, 长期的治疗是必需的, 这样可能会最大限度地耗竭cccDNA池的储量。

3.2 IFN及其与核苷(酸)类似物联合治疗对HBV cccDNA的影响 陆海英等^[46]研究了71例接受LMV, IFN- α 单药治疗或LMV-IFN- α 序贯治疗患者肝内HBV cccDNA的变化。治疗结束时, LMV-IFN- α 序贯、LMV和IFN- α 治疗的患者肝内cccDNA水平分别为3.4 log₁₀, 3.8 log₁₀和

5.0 log10, 均显著低于治疗前的基线水平. 出现HBeAg血清学转换的患者, 肝内cccDNA下降的幅度显著大于HBeAg未消失的患者(3.0 log10 vs 1.6 log10). 抗病毒治疗患者肝内cccDNA的变化与HBV基因型无关. 并且发现, 治疗12 wk时取得病毒学应答的患者肝内cccDNA下降的中位水平为1.1 log10, 而无病毒学应答者下降了0.5 log10, 两者存在显著统计学差异, 提示治疗12 wk的病毒学应答对肝内cccDNA的下降具有预测价值^[47].

在26例接受聚乙二醇IFN- α 2b(PEG-IFN- α 2b)和ADV联合治疗的患者中, 治疗48 wk时肝内总HBV DNA和cccDNA中位水平分别下降了2.2 log10和2.4 log10, 发生HBeAg消失的患者肝内cccDNA水平比未消失患者更低, HBsAg阳性肝细胞数量明显减少, 其中4例患者发生了HBsAg血清学转换^[48]. 结果表明, 联合治疗可以显著降低肝内cccDNA, 因而有利于患者获得HBsAg的阴转. 在17例接受PEG-IFN- α 2b和ETV联合治疗的患者中, 治疗48 wk时, 肝内cccDNA均值下降到1.4 log拷贝/ μ g. 11例未发生病毒学复发的患者中, 治疗结束时绝大多数患者cccDNA水平很低, 只有2例cccDNA水平高于4.5 log拷贝/ μ g, 而所有复发的患者肝内cccDNA水平均较高^[49]. 该研究也提示, 联合治疗有利于降低慢性乙型肝炎患者肝内cccDNA水平. 因此, 对现有的抗病毒药物在治疗策略上进行进一步探讨, 对提高慢性乙型肝炎临床治愈率有非常重要的现实意义.

4 结论

应用现有的抗病毒药物, 以及参考目前国内外各个肝病指南推荐的抗病毒治疗方案, 在很大程度上难以有效清除HBV cccDNA. IFN除了已知的作用机制以外, 随着对其开展的进一步探讨, 发现IFN还具有直接降解HBV cccDNA的作用^[50]. 因此, 针对患者的免疫学水平, 病毒学状况, 以及可能正在实施的抗病毒方案, 研究新的IFN治疗策略, 包括更合适的时机, 药物的剂量、疗程, 与核苷(酸)类似物的序贯或联合治疗等等, 可能会在现有药物的基础上使患者获得更高的HBsAg消失率或血清转换率, 进一步提高患者的临床治愈率. 而核苷(酸)类似物主要是病毒DNA聚合酶抑制剂, 只是干预细胞浆内pgRNA反转录形成病毒负链DNA和以负链为模板合成正链DNA的过程. 治疗期间引

起cccDNA的降低主要是子代病毒量的减少, 导致rcDNA也相应减少, 最终导致cccDNA补充不足. 另外, 抗病毒治疗获得的肝脏组织学改善引起cccDNA池的不稳定, 使很多感染了病毒的肝细胞发生cccDNA被清除. 因此, 核苷(酸)类似物治疗导致的cccDNA下降是一个间接的过程, 长期有效的治疗可能具有耗竭HBV cccDNA的作用.

除了目前被批准上市的抗病毒药物以外, 开发新的能清除HBV cccDNA的药物是患者和医生的共同期待. 通过上述在细胞、动物和临床上开展的研究, 让我们对今后治愈慢性乙型肝炎抱有很大的信心. 从理论上说, 在HBV复制环节上, 从HBV脱去外膜进入肝细胞, 在细胞浆中脱去核膜成为rcDNA并进入细胞核, cccDNA的形成及其转录, pgRNA的合成与装配, 到子代病毒的装配与释放等等, 如果能够在这些HBV复制环节和靶点上再多开发一些有效的药物, 我们将会更多的措施应对目前的困局. 当然, 对于治愈HBV感染来说, 最重要的还是要考虑到cccDNA的因素. 鉴于cccDNA是在细胞核内形成的, 因此, 清除cccDNA的药物最好能够在细胞核内cccDNA形成的各个环节上发挥作用. 但对于cccDNA分子在细胞核内形成的一些关键环节, 目前还不十分清楚, 诸如rcDNA分子是如何通过核转位从细胞浆进入细胞核的? rcDNA在细胞核内是如何去掉负链的末端蛋白和正链寡RNA帽的? 部分互补的rcDNA是如何启动缺口修复程序的? 修补的DNA聚合酶是来自病毒自身还是宿主的? cccDNA是利用病毒自身还是宿主的解旋酶、拓扑异构酶等从环状双链分子进一步折叠形成超螺旋cccDNA分子的等. 今后, 在深入开展对HBV分子生物学研究的基础上, 通过新药研发和进一步的临床研究, 彻底清除HBV cccDNA, 治愈乙型肝炎的目标是完全可能实现的.

同行评价

本文能结合目前国内外乙型肝炎领域的治疗难点和热点立题, 对近年来国内外开展的影响HBV cccDNA水平的多种药物和治疗方案进行了综合分析, 为专业人员全面地了解清除HBV cccDNA的研究现状提供有价值的参考. 文章的撰写思路清晰, 层次分明, 逻辑性强.

5 参考文献

- Chen TM, Chang CC, Huang PT, Wen CF, Lin CC. Performance of risk estimation for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B (REACH-B) score in classifying treatment eligibility under 2012 Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) guideline for chronic hepatitis B patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 37: 243-251 [PMID: 23171385 DOI: 10.1111/apt.12144]
- Koh C, Zhao X, Samala N, Sakiani S, Liang TJ,

- Talwalkar JA. AASLD clinical practice guidelines: a critical review of scientific evidence and evolving recommendations. *Hepatology* 2013; 58: 2142-2152 [PMID: 23775835 DOI: 10.1002/hep.26578]
- 3 European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012; 57: 167-185 [PMID: 22436845 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.02.010]
- 4 Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2009; 51: 581-592 [PMID: 19616338 DOI: 10.1016/j.jhep.2009.05.022]
- 5 Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, Zhang K, Stadler D, Cheng X, Sprinzl MF, Koppensteiner H, Makowska Z, Volz T, Remouchamps C, Chou WM, Thasler WE, Hüser N, Durantel D, Liang TJ, Münk C, Heim MH, Browning JL, Dejardin E, Dandri M, Schindler M, Heikenwalder M, Protzer U. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science* 2014; 343: 1221-1228 [PMID: 24557838 DOI: 10.1126/science.1243462]
- 6 Narvaiza I, Linfesty DC, Greener BN, Hakata Y, Pintel DJ, Logue E, Landau NR, Weitzman MD. Deaminase-independent inhibition of parvoviruses by the APOBEC3A cytidine deaminase. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000439 [PMID: 19461882 DOI: 10.1371/journal.ppat.1000439]
- 7 Stenglein MD, Burns MB, Li M, Lengyel J, Harris RS. APOBEC3 proteins mediate the clearance of foreign DNA from human cells. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17: 222-229 [PMID: 20062055 DOI: 10.1038/nmsb.1744]
- 8 Belloni L, Allweiss L, Guerrieri F, Pediconi N, Volz T, Pollicino T, Petersen J, Raimondo G, Dandri M, Levrero M. IFN- α inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome. *J Clin Invest* 2012; 122: 529-537 [PMID: 22251702 DOI: 10.1172/JCI58847]
- 9 Liu F, Campagna M, Qi Y, Zhao X, Guo F, Xu C, Li S, Li W, Block TM, Chang J, Guo JT. Alpha-interferon suppresses hepadnavirus transcription by altering epigenetic modification of cccDNA minichromosomes. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003613 [PMID: 24068929 DOI: 10.1371/journal.ppat.1003613]
- 10 Parvez MK, Sehgal D, Sarin SK, Basir SF, Jameel S. Inhibition of hepatitis B virus DNA replicative intermediate forms by recombinant interferon-gamma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3006-3014 [PMID: 16718779]
- 11 Zhang T, Cai J, Chang J, Yu D, Wu C, Yan T, Zhai K, Bi X, Zhao H, Xu J, Tan W, Qu C, Lin D. Evidence of associations of APOBEC3B gene deletion with susceptibility to persistent HBV infection and hepatocellular carcinoma. *Hum Mol Genet* 2013; 22: 1262-1269 [PMID: 23213177 DOI: 10.1093/hmg/dd513]
- 12 Chowdhury S, Kitamura K, Simadu M, Koura M, Muramatsu M. Concerted action of activation-induced cytidine deaminase and uracil-DNA glycosylase reduces covalently closed circular DNA of duck hepatitis B virus. *FEBS Lett* 2013; 587: 3148-3152 [PMID: 23954625 DOI: 10.1016/j.febslet.2013.07.055]
- 13 Li GQ, Gu HX, Li D, Xu WZ. Inhibition of Hepatitis B virus cccDNA replication by siRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 355: 404-408 [PMID: 17300745]
- 14 Li GQ, Yu DM, Lu J, Chen SL, Zhao JY, Wang YC. Study of the efficacy of combination therapy of SiRNAs in HepG2.2.15 cells. *Hepatogastroenterology* 2011; 58: 570-574 [PMID: 21661433]
- 15 Xin XM, Li GQ, Jin YY, Zhuang M, Li D. Combination of small interfering RNAs mediates greater suppression on hepatitis B virus cccDNA in HepG2.2.15 cells. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3849-3854 [PMID: 18609708]
- 16 Xie Q, Zhang S, Wang W, Li YM, Du T, Su XL, Wei YQ, Deng HX. Inhibition of hepatitis B virus gene expression by small interfering RNAs targeting cccDNA and X antigen. *Acta Virol* 2012; 56: 49-55 [PMID: 22404609]
- 17 Kim JW, Lee SH, Park YS, Jeong SH, Kim N, Lee DH. [Inhibition of in vitro hepatitis B virus replication by lentivirus-mediated short-hairpin RNA against HBx]. *Korean J Hepatol* 2009; 15: 15-24 [PMID: 19346782 DOI: 10.3350/kjhep.2009.15.1.15]
- 18 Park HK, Min BY, Kim NY, Jang ES, Shin CM, Park YS, Hwang JH, Jeong SH, Kim N, Lee DH, Kim JW. Short hairpin RNA induces methylation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 436: 152-155 [PMID: 23727428 DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.04.108]
- 19 Papworth M, Moore M, Isalan M, Minczuk M, Choo Y, Klug A. Inhibition of herpes simplex virus 1 gene expression by designer zinc-finger transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 1621-1626 [PMID: 12574501]
- 20 Zimmerman KA, Fischer KP, Joyce MA, Tyrrell DL. Zinc finger proteins designed to specifically target duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA inhibit viral transcription in tissue culture. *J Virol* 2008; 82: 8013-8021 [PMID: 18524822 DOI: 10.1128/JVI.00366-08]
- 21 Cradick TJ, Keck K, Bradshaw S, Jamieson AC, McCaffrey AP. Zinc-finger nucleases as a novel therapeutic strategy for targeting hepatitis B virus DNAs. *Mol Ther* 2010; 18: 947-954 [PMID: 20160705 DOI: 10.1038/mt.2010.20]
- 22 Weber ND, Stone D, Sedlak RH, De Silva Feelixge HS, Roychoudhury P, Schiffer JT, Aubert M, Jerome KR. AAV-mediated delivery of zinc finger nucleases targeting hepatitis B virus inhibits active replication. *PLoS One* 2014; 9: e97579 [PMID: 24827459 DOI: 10.1371/journal.pone.0097579]
- 23 Bloom K, Ely A, Mussolino C, Cathomen T, Arbuthnot P. Inactivation of hepatitis B virus replication in cultured cells and in vivo with engineered transcription activator-like effector nucleases. *Mol Ther* 2013; 21: 1889-1897 [PMID: 23883864 DOI: 10.1038/mt.2013.170]
- 24 Chen J, Zhang W, Lin J, Wang F, Wu M, Chen C, Zheng Y, Peng X, Li J, Yuan Z. An efficient antiviral strategy for targeting hepatitis B virus genome using transcription activator-like effector nucleases. *Mol Ther* 2014; 22: 303-311 [PMID: 24827459 DOI: 10.1371/journal.pone.0097579]

- 24025750 DOI: 10.1038/mt.2013.212]
- 25 Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet* 2011; 45: 273-297 [PMID: 22060043 DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132430]
 - 26 Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9: 467-477 [PMID: 21552286 DOI: 10.1038/nrmicro2577]
 - 27 Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 2012; 482: 331-338 [PMID: 22337052 DOI: 10.1038/nature10886]
 - 28 Lin SR, Yang HC, Kuo YT, Liu CJ, Yang TY, Sung KC, Lin YY, Wang HY, Wang CC, Shen YC, Wu FY, Kao JH, Chen DS, Chen PJ. The CRISPR/Cas9 System Facilitates Clearance of the Intrahepatic HBV Templates In Vivo. *Mol Ther Nucleic Acids* 2014; 3: e186 [PMID: 25137139 DOI: 10.1038/mtna.2014.38]
 - 29 Schiffer JT, Swan DA, Stone D, Jerome KR. Predictors of hepatitis B cure using gene therapy to deliver DNA cleavage enzymes: a mathematical modeling approach. *PLoS Comput Biol* 2013; 9: e1003131 [PMID: 23861664 DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003131]
 - 30 Cai D, Mills C, Yu W, Yan R, Aldrich CE, Saputelli JR, Mason WS, Xu X, Guo JT, Block TM, Cuconati A, Guo H. Identification of disubstituted sulfonamide compounds as specific inhibitors of hepatitis B virus covalently closed circular DNA formation. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 4277-4288 [PMID: 22644022 DOI: 10.1128/AAC.00473-12]
 - 31 Bohne F, Chmielewski M, Ebert G, Wiegmann K, Kürschner T, Schulze A, Urban S, Krönke M, Abken H, Protzer U. T cells redirected against hepatitis B virus surface proteins eliminate infected hepatocytes. *Gastroenterology* 2008; 134: 239-247 [PMID: 18166356 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.11.002]
 - 32 Li G, Jiang G, Lu J, Chen S, Cui L, Jiao J, Wang Y. Inhibition of hepatitis B virus cccDNA by siRNA in transgenic mice. *Cell Biochem Biophys* 2014; 69: 649-654 [PMID: 24569930 DOI: 10.1007/s12013-014-9847-1]
 - 33 Li G, Fu L, Jiang J, Ping Y, Huang Y, Wang Y. siRNA combinations mediate greater suppression of hepatitis B virus replication in mice. *Cell Biochem Biophys* 2014; 69: 641-647 [PMID: 24549857 DOI: 10.1007/s12013-014-9846-2]
 - 34 Kitamura K, Wang Z, Chowdhury S, Simadu M, Koura M, Muramatsu M. Uracil DNA glycosylase counteracts APOBEC3G-induced hypermutation of hepatitis B viral genomes: excision repair of covalently closed circular DNA. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003361 [PMID: 23696735 DOI: 10.1371/journal.ppat.1003361]
 - 35 Menne S, Tumas DB, Liu KH, Thampi L, AlDeghaither D, Baldwin BH, Bellezza CA, Cote PJ, Zheng J, Halcomb R, Fosdick A, Fletcher SP, Daffis S, Li L, Yue P, Wolfgang GH, Tennant BC. Sustained efficacy and seroconversion with the Toll-like receptor 7 agonist GS-9620 in the Woodchuck model of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2015; 62: 1237-1245 [PMID: 25559326 DOI: 10.1016/j.jhep.2014.12.026]
 - 36 Lutgehetmann M, Volz T, Köpke A, Broja T, Tigges E, Lohse AW, Fuchs E, Murray JM, Petersen J, Dandri M. In vivo proliferation of hepadnavirus-infected hepatocytes induces loss of covalently closed circular DNA in mice. *Hepatology* 2010; 52: 16-24 [PMID: 20578126 DOI: 10.1002/hep.23611]
 - 37 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 [PMID: 15842584]
 - 38 Wong DK, Seto WK, Fung J, Ip P, Huang FY, Lai CL, Yuen MF. Reduction of hepatitis B surface antigen and covalently closed circular DNA by nucleos(t)ide analogues of different potency. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11: 1004-1010.e1 [PMID: 23376799 DOI: 10.1016/j.cgh.2013.01.026]
 - 39 李菲菲, 任万华, 丁贵航, 石军, 韩国庆. 肝组织 cccDNA水平与血清病毒学应答后治疗时间的关系. *中华肝脏病杂志* 2009; 17: 167-170
 - 40 Bourne EJ, Dienstag JL, Lopez VA, Sander TJ, Longlet JM, Hall JG, Kwiatkowski RW, Wright T, Lai CL, Condreay LD. Quantitative analysis of HBV cccDNA from clinical specimens: correlation with clinical and virological response during antiviral therapy. *J Viral Hepat* 2007; 14: 55-63 [PMID: 17212645]
 - 41 Wong DK, Yuen MF, Ngai VW, Fung J, Lai CL. One-year entecavir or lamivudine therapy results in reduction of hepatitis B virus intrahepatic covalently closed circular DNA levels. *Antivir Ther* 2006; 11: 909-916 [PMID: 17302253]
 - 42 Zheng Q, Zhu YY, Chen J, Liu YR, You J, Dong J, Zeng DW, Gao LY, Chen LH, Jiang JJ. Decline in intrahepatic cccDNA and increase in immune cell reactivity after 12 weeks of antiviral treatment were associated with HBeAg loss. *J Viral Hepat* 2014; 21: 909-916 [PMID: 24888640 DOI: 10.1111/jvh.12261]
 - 43 Cheng PN, Liu WC, Tsai HW, Wu IC, Chang TT, Young KC. Association of intrahepatic cccDNA reduction with the improvement of liver histology in chronic hepatitis B patients receiving oral antiviral agents. *J Med Virol* 2011; 83: 602-607 [PMID: 21328373 DOI: 10.1002/jmv.22014]
 - 44 Ruan P, Zhou B, Dai X, Sun Z, Guo X, Huang J, Gong Z. Predictive value of intrahepatic hepatitis B virus covalently closed circular DNA and total DNA in patients with acute hepatitis B and patients with chronic hepatitis B receiving anti-viral treatment. *Mol Med Rep* 2014; 9: 1135-1141 [PMID: 24566465 DOI: 10.3892/mmr.2014.1972]
 - 45 Shi M, Sun WL, Hua YY, Han B, Shi L. Effects of entecavir on hepatitis B virus covalently closed circular DNA in hepatitis B e antigen-positive patients with hepatitis B. *PLoS One* 2015; 10: e0117741 [PMID: 25647607 DOI: 10.1371/journal.pone.0117741]
 - 46 陆海英, 庄立伟, 于岩岩, 斯崇文, 李俊. 抗病毒药物对肝组织乙型肝炎病毒共价闭环环状DNA的影响. *中华肝脏病杂志* 2008; 16: 198-202
 - 47 Lu HY, Zhuang LW, Yu YY, Si CW. Virological response to antiviral therapy at week 12 indicates a great reduction of intrahepatic hepatitis B virus

- DNA and cccDNA in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients. *J Viral Hepat* 2010; 17 Suppl 1: 59-65 [PMID: 20586935]
- 48 Wursthorn K, Lutgehetmann M, Dandri M, Volz T, Buggisch P, Zollner B, Longerich T, Schirmacher P, Metzler F, Zankel M, Fischer C, Currie G, Brosgart C, Petersen J. Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2006; 44: 675-684 [PMID: 16941693]
- 49 Hagiwara S, Kudo M, Osaki Y, Matsuo H, Inuzuka T, Matsumoto A, Tanaka E, Sakurai T, Ueshima K, Inoue T, Yada N, Nishida N. Impact of peginterferon alpha-2b and entecavir hydrate combination therapy on persistent viral suppression in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol* 2013; 85: 987-995 [PMID: 23588724 DOI: 10.1002/jmv.23564]
- 50 Ding S, Robek MD. Cytidine deamination and cccDNA degradation: A new approach for curing HBV? *Hepatology* 2014; 60: 2118-2121 [PMID: 25142126 DOI: 10.1002/hep.27386]

编辑: 郭鹏 电编: 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》于 2012-12-26 获得 RCCSE 中国权威学术期刊 (A+) 称号

本刊讯 《世界华人消化杂志》在第三届中国学术期刊评价中被武汉大学中国科学评价研究中心(RCCSE)评为“RCCSE中国权威学术期刊(A+)”。本次共有6 448种中文学术期刊参与评价,计算出各刊的最终得分,并将期刊最终得分按照从高到低依次排列,按照期刊在学科领域中的得分划分到A+、A、A-、B+、B、C级6个排名等级范围. 其中A+(权威期刊)取前5%; A(核心期刊)取前5%-20%; A-(扩展核心期刊)取前20%-30%; B+(准核心期刊)取前30%-50%; B(一般期刊)取前50%-80%; C(较差期刊)为80%-100%.