

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.23.013

乙肝患者肝组织乙型肝炎病毒 cccDNA 和血清 MIF 表达的相关性研究 *

尹晶晶¹ 谢明^{2Δ} 董艳迎³ 刘军辉¹ 袁瑞丽¹ 王晓岩¹

(1 西安交通大学医学部 西安交通大学第一附属医院检验科 陕西 西安 710061;

2 西安交通大学医学部免疫学与病原生物学系 陕西 西安 710061; 3 西安交通大学第二附属医院检验科 陕西 西安 710014)

摘要 目的:探讨乙肝患者肝组织乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)共价闭合环状 DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)和血清巨噬细胞移动抑制因子(Macrophage migration inhibitory factor, MIF)的表达相关性。**方法:**选择 2016 年 2 月到 2016 年 7 月在我院诊治的乙肝患者 144 例作为乙肝组, 同期选择体格检查健康者 144 例作为对照组, 采集所有入选者的血清样本, 检测血清 MIF、谷丙转氨酶(Glutamic pyruvic transaminase, ALT)、谷草转氨酶(Glutamic pyruvic aminotransferase, AST)、总胆红素(total bilirubin, TBIL) 的表达, 并对乙肝组患者肝组织 HBV cccDNA 采用荧光定量 PCR 技术检测表达分析, 直线相关分析乙肝组的血清 HBV cccDNA 表达量与血清 ALT、TBiL、AST、MIF 含量相关性。**结果:**乙肝组的血清 MIF、ALT、TBiL、AST 含量均明显高于对照组($P<0.05$)。乙肝组的肝组织 HBV cccDNA 阳性率为 54.17%(78/144)。直线相关分析显示乙肝组的肝组织 HBV cccDNA 表达量与血清 ALT、TBiL、AST、MIF 含量均呈现明显正相关性($P<0.05$)。**结论:**乙肝患者体内血清 MIF 水平明显升高, 伴肝组织 HBV cccDNA 的表达也升高, 两者存在明显的正相关性。因此检测血清 MIF 水平有助于评估乙肝患者 HBV 的感染情况。

关键词:乙肝; 巨噬细胞移动抑制因子; 肝组织; 乙型肝炎病毒共价闭合环状 DNA

中图分类号:R512.62 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)23-4456-04

Relationship between the Expression of Liver Tissue Hepatitis B Virus cccDNA and Serum MIF in Patients with Hepatitis B*

YIN Jing-jing¹, XIE Ming^{2Δ}, DONG Yan-ying³, LIU Jun-hui¹, YUAN Rui-li¹, WANG Xiao-yan¹

(1 Medicine Department, Xi'an Jiao Tong University, Clinical laboratory Department, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiao Tong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China;

2 Department of Immunology and pathogenic biology, Xi'an Jiaotong University Health Science Center, Xi'an, Shaanxi, 710061, China;

3 Department of Clinical laboratory, Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiao Tong University, Xi'an, Shaanxi, 710014, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the correlation of the expression of liver tissue hepatitis B (HBV) virus cccDNA with serum macrophage migration inhibitory factor (MIF) in patients with hepatitis B. **Methods:** From February 2016 to July 2016, 144 cases of patients with hepatitis B in our hospital were selected as the hepatitis B group, and the other 144 cases of healthy controls undergoing physical examination were selected as the control group at the same time. The expression of HBV cccDNA in the liver tissue of patients with hepatitis B was detected by real-time quantitative PCR. The correlation of HBV cccDNA expression and serum ALT, TBiL, AST and MIF levels in hepatitis B group was analyzed by linear correlation analysis. **Results:** The serum levels of MIF, ALT, TBiL and AST in the hepatitis B group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). The positive rate of HBV cccDNA in liver tissue of hepatitis B group was 54.17%(78/144). The linear correlation analysis showed that the expression of HBV cccDNA were positively correlated with the serum ALT, TBiL, AST and MIF levels ($P<0.05$). **Conclusion:** The level of serum MIF was positively correlated with the expression of HBV cccDNA in the liver tissue of patients with hepatitis B, Therefore, the detection of serum MIF level can contribute to assess the HBV infection in hepatitis B patients.

Key words: Hepatitis B; Macrophage migration inhibitory factor; LIVER tissue; HBV cccDNA

Chinese Library Classification(CLC): R512.62 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)23-4456-04

前言

慢性乙型肝炎简称乙肝, 当前在我国的发病人数比较多^[1,2]。

现代研究表明乙肝的发病机制主要是肝细胞发生不同程度的免疫病理损伤, 其中乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)本身并不直接损伤肝细胞, 但是各种复杂的细胞因子对炎症活动发挥了

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81671545)

作者简介: 尹晶晶(1986-), 女, 硕士研究生, 检验师, 研究方向: 生化免疫类检验, 电话: 15991348696, E-mail: yinjingjing1314520@163.com

Δ 通讯作者: 谢明(1959-), 男, 硕士, 教授, 主要研究方向: 抗感染免疫, E-mail: yinjingjing1314520@163.com

(收稿日期: 2018-07-10 接受日期: 2018-07-31)

重要作用^[3]。我国是乙肝的高发区,其中约 1/4 的患者可形成重型慢性肝病、肝硬化及肝癌,造成严重预后。现代研究表明乙肝以多种生化指标异常为特点,其预后与肝细胞的再生速度有关,也与肝细胞坏死程度等有关^[4]。患者一旦感染 HBV,在肝细胞核内可检测到 cccDNA(covalently closed circular DNA,共价闭合环状 DNA)^[5,6]。相关研究也表明宿主感染 HBV 后,只要肝细胞核内存在 cccDNA,患者抗病毒治疗的效果欠佳^[7]。但肝组织 HBV cccDNA 检测因操作繁琐、取材困难,不适宜普遍开展^[8]。巨噬细胞移动抑制因子(MIF)是一种重要的促炎细胞因子,是一种含有 115 个氨基酸的蛋白质,能够抑制巨噬细胞游走,在机体炎症和免疫反应起着重要的作用^[9,10]。本研究主要探讨了乙肝患者肝组织乙型肝炎病毒 cccDNA 和血清 MIF 表达的相关性,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

采用回顾性、总结研究方法,研究时间为 2016 年 2 月到 2016 年 7 月,选择在我院诊治的乙肝患者 144 例作为乙肝组,同期选择体格检查健康者 144 例作为对照组。纳入标准:所有入选者均被告知并签署知情同意书;年龄 20-80 岁;乙肝组符合最新的乙肝诊断标准,经血清免疫学检查确诊;临床与检验资料完整;医院伦理委员会批准了此次研究。排除标准:酒精性肝病和非酒精性脂肪肝等造成肝脏损害者;合并甲、丙、丁、戊型病毒性肝炎患者;妊娠与哺乳期妇女。观察组中,男 74 例,女 70 例;年龄最小 24 岁,最大 76 岁,平均年龄 48.22 ± 8.29 岁;平均病程为 8.19 ± 0.78 年;平均体重指数为 23.11 ± 2.48 kg/m²。对照组中,男 76 例,女 68 例;年龄最小 21 岁,最大 79 岁,平均年龄 48.42 ± 4.28 岁;平均体重指数为 23.98 ± 2.11

kg/m²。两组患者上述资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 标本采集

采集所有入选者的空腹静脉血 3-5 mL,置于非抗凝干燥无菌真空管中,1500 rpm 离心 5 min,取上清液,放入 -70℃ 低温冰箱保存。在肝组织样本选择中,入选者行肝活组织检查,用 B 超引导下快速穿刺法,送检肝组织,也立即放入 -70℃ 冰箱保存。

1.3 检测指标

采用美国贝克曼全自动分析仪检测,按速率法进行检测血清 MIF、谷丙转氨酶(Glutamic pyruvic transaminase,ALT)、谷草转氨酶(Glutamic pyruvic aminotransferase,AST)、总胆红素(total bilirubin,TBIL)的水平。肝组织 HBV cccDNA 检测的初始模板由基因组 DNA 提取试剂盒进行提取,采用荧光定量 PCR 技术检测表达量,试剂盒购于上海复星医学科技有限公司,操作严格按说明书进行。采用 ELISA 法检测 MIF,试剂盒购自美国 Rapid Bio-Lab 公司,实验操作均严格按说明书进行。

1.4 统计学分析

选择 SPSS20.00 for windows 软件对本研究所涉及的所有数据进行分析,计量资料数据以均数 $\pm$ 标准差或中位数(下四分位数,上四分位数)表示,组间比较采用 t 检验,计数数据采用%表示,组间比较采用 χ^2 分析,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 MIF、ALT、TBiL、AST 含量的对比

乙肝组的血清 ALT、TBiL、AST 含量明显高于对照组,对比差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 两组血清 MIF、ALT、TBiL、AST 含量的对比(均数 $\pm$ 标准差)

Table 1 Comparison of contents of serum MIF, ALT, TBiL and AST between two groups (mean $\pm$ standard deviation)

Groups	n	MIF(μ g/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBiL(μ mol/L)
Hepatitis B group	144	9.08 ± 2.19	188.39 ± 45.29	142.20 ± 45.21	102.49 ± 22.84
Control group	144	1.98 ± 0.92	26.20 ± 10.29	30.78 ± 9.91	34.29 ± 11.81
P		<0.001	<0.05	<0.05	<0.05

2.2 乙肝组 HBV cccDNA 的阳性率

乙肝组的肝组织 HBV cccDNA 阳性率为 54.17%(78/144)。

2.3 相关性分析

在乙肝组中,肝组织 HBV cccDNA 相对表达量与血清 ALT、TBiL、AST、MIF 含量经直线相关分析都呈现明显正相关性($P<0.05$)。见表 2。

表 2 乙肝患者肝组织 HBV cccDNA 相对表达量与 ALT、TBiL、AST、MIF 的相关性分析(n=144)

Table 2 Correlation between liver tissue HBV cccDNA relative expression and ALT, TBiL, AST, MIF in patients with hepatitis B (n=144)

Index	ALT	TBiL	AST	MIF
r	0.762	0.563	0.661	0.489
P	0.000	0.001	0.000	0.005

3 讨论

目前乙肝的发病机制尚不明确,一般认为是由机体免疫应答引起的病理损伤所致,其病理损伤部位主要以淋巴细胞浸润

为主,HBV 感染所引起的机体免疫应答异常与细胞因子的紊乱有关^[11,12]。HBV 侵入人体后,先后脱去衣壳、包膜,以 HBV rcDNA (松弛环状 DNA) 的形式进入肝细胞核内,然后形成 HBV cccDNA,作用介质为宿主 DNA 聚合酶 cccDNA。HBV

cccDNA 可为慢性乙肝的诊断提供客观依据,也将成为 HBV 感染复制的重要指标。以 HBV cccDNA 作为模板,感染入侵的病毒,新合成的 rcDNA 从胞浆转入胞核内,然后在病毒逆转录酶、宿主 RNA 聚合酶的作用下,肝细胞核内的 cccDNA 有双重来源维持其量的稳定,可合成子代病毒 DNA,部分子代病毒不出胞,最后包装形成完整的病毒,新合成的 rcDNA 从胞浆转入胞核内,rcDNA 再次转化为 cccDNA 继续病毒的复制。只要肝细胞内存在 HBV cccDNA,HBV 的复制就会持续,也表明 HBV cccDNA 在 HBV 复制周期中发挥着关键作用。

MIF 是一种含有 115 个氨基酸的蛋白质,能够抑制巨噬细胞游走,促进巨噬细胞在炎症局部聚集和分泌一些细胞因子^[13]。有研究表明慢性乙肝及肝硬化患者血清 MIF 水平均升高,其中肝硬化患者血清 MIF 水平比慢性乙肝患者增高^[14]。随着 HBV 感染,相关性肝病肝细胞病理损伤的加重和癌变,MIF 表达增加^[15]。本研究显示乙肝组的血清 MIF 含量明显高于对照组。从机制上分析,MIF 经细菌代谢产物脂多糖及细胞因子刺激后由巨噬细胞释放,以增强巨噬细胞促炎细胞因子^[16];且 MIF 可上调基质金属蛋白酶的功能(MMPs)功能,通过上调 MMPs 的表达而介导细胞基质的降解^[17]。尤其在肝炎的免疫病理损伤中,肝细胞可分泌大量 MIF,介导其他细胞因子损伤肝细胞^[18,19]。HBV cccDNA 的含量比较少,是嗜肝 DNA 病毒在肝内进行复制的原始模板,其位于宿主肝细胞的细胞核而非细胞浆中,是维持病毒在细胞内的复制过程关键因子,对建立病毒在宿主细胞内感染状态也有重要意义。在病毒的复制过程中,病毒 DNA 两条链的缺口均被补齐,然后进入宿主细胞核,形成超螺旋 cccDNA 分子,超螺旋 cccDNA 分子在电镜下的大小为 3.2kb 左右。近年来,随着临床医生对 cccDNA 检测临床意义的认识不断提高和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术为日渐成熟,cccDNA 检测已经得到了广泛了应用,也取得了很好的监测与检测效果。HBV cccDNA 仅存在于肝细胞的细胞核内,相对含量比较低,在接受抗病毒治疗的情况下含量更低,目前最可靠的 HBV cccDNA 检测标本是肝脏组织,约为 30~50 copies/cell。

有研究显示肝组织 HBV cccDNA 与血清 MIF 有一定的相关性,血清 MIF 的检测有可能作为慢性乙型肝炎患者肝脏损伤、HBV 活化的早期信号与关键因子。HBeAg 阴性患者和 HBeAg 阳性患者的肝组织内 HBV cccDNA 水平与血清 MIF 水平有很好的相关性。随着 HBeAg 阳性的出现,肝内、血清的 HBV cccDNA 和 MIF 水平可显著下降,使得 HBV cccDNA 可成为肝内 HBV DNA 的主要形式。肝组织中 HBV cccDNA 水平与肝组织 HBsAg 定量呈高度正相关,肝组织 HBsAg 定量可作为反映肝组织中 HBV cccDNA 水平的指标。HBV cccDNA 消失是 HBV 彻底根治的真正标志,但 HBV cccDNA 需要进行肝组织活检,对患者有一定的创伤性,且 HBV cccDNA 检测特异度、灵敏度较低。HBV cccDNA 是 HBV 循环复制以及持续感染的关键因素,是 HBV 前基因组 RNAs 复制的原始模板。HBsAg 水平并不能完全反映肝组织内 HBV cccDNA 的水平,血清 MIF 虽然有显著下降,但是 HBsAg 的下降无显著差异,并且肝组织内 HBV cccDNA、HBV DNA 可持续存在^[20,21]。肝组织是 HBV 复制的主要场所,肝组织 HBV cccDNA 的检测能更

精确地反映 HBV 复制的程度与在肝细胞内的感染情况^[22,23]。本研究显示乙肝组的肝组织 HBV cccDNA 阳性率为 54.17% (78/144)。然而,并不是所有的患者都能接受肝活检这项创伤性检查,在临床上也需要慎重使用^[24],临床上常以肝组织 HBsAg 消失和 / 或 anti-HBs 肝组织学转换作为实现 HBV 感染功能性治愈(临床治愈)的标志,但也有部分接受长期治疗的 HBV 患者 HBsAg 消失的比例较低,因此在临床上要合理选择治愈性判断标志。

有研究表明慢性乙肝患者肝组织 HBV cccDNA 水平较正常人增高,且与 ALT 水平和肝脏炎症反应坏死程度存在正相关^[25]。本研究结果显示乙肝组的肝组织 HBV cccDNA 相对表达量与血清 ALT、TBiL、AST、MIF 含量都呈现明显正相关性,表明 MIF 在乙肝免疫清除过程中可能参与了肝组织的损伤过程。MIF 是一种主要由巨噬细胞和活化 T 淋巴细胞分泌的可溶性淋巴因子,可抑制巨噬细胞移动^[26]。相关研究证实 MIF 与 HBV 感染所致的肝脏炎症反应及肝细胞癌的形成密切相关^[27,28]。肝组织 HBV RNA 具有反映患者肝组织内 cccDNA 活性的优越性,肝组织 HBV RNA 持续消失可反映患者肝组织内 HBV cccDNA 表达静默状态或者消失状态。但部分患者整合的病毒 DNA 片段可以持续低水平表达 HBsAg,肝组织 HBsAg 也有可能出现低值阳性,在临床上也需要合理选择检测指标^[29,30]。

总之,乙肝患者体内血清 MIF 水平明显升高,伴肝组织 HBV cccDNA 的阳性表达,且两者存在明显的相关性,检测血清 MIF 水平有助于评估乙肝患者 HBV 的感染情况。

参考文献(References)

- [1] Mu D, Yuan FC, Chen Y, et al. Baseline value of intrahepatic HBV DNA over cccDNA predicts patient's response to interferon therapy [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 5937
- [2] Wu Z, Tan S, Xu L, et al. NgAgo-gDNA system efficiently suppresses hepatitis B virus replication through accelerating decay of pregenomic RNA[J]. *Antiviral Res*, 2017, 12(145): 20-23
- [3] Malagnino V, Salpini R, Maffongelli G, et al. High rates of chronic HBV genotype E infection in a group of migrants in Italy from West Africa: Virological characteristics associated with poor immune clearance[J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0195045
- [4] Lucifora J, Salvetti A, Marniquet X, et al. Detection of the hepatitis B virus (HBV) covalently-closed-circular DNA (cccDNA) in mice transduced with a recombinant AAV-HBV vector [J]. *Antiviral Res*, 2017, 11(145): 14-19
- [5] 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
- [6] Gao S, Duan ZP, Chen Y, et al. Compartmental HBV evolution and replication in liver and extrahepatic sites after nucleos(tide) analogue therapy in chronic hepatitis B carriers [J]. *J Clin Virol*, 2017, 5(94): 8-14
- [7] Sari O, Boucle S, Cox BD, et al. Synthesis of sulfamoylbenzamide derivatives as HBV capsid assembly effector [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 29(138): 407-421
- [8] Arora A, Singh SP, Kumar A, et al. INASL Position Statements on Prevention, Diagnosis and Management of Hepatitis B Virus Infection

- in India: The Andaman Statements[J]. *J Clin Exp Hepatol*, 2018, 8(1): 58-80
- [9] 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
- [10] Zhang Y, He S, Guo JJ, et al. Retinoid X Receptor α -Dependent HBV Minichromosome Remodeling and Viral Replication[J]. *Ann Hepatol*, 2017, 16(4): 501-509
- [11] Chauhan R, Lingala S, Gadiparthi C, et al. Reactivation of hepatitis B after liver transplantation: Current knowledge, molecular mechanisms and implications in management [J]. *World J Hepatol*, 2018, 10(3): 352-370
- [12] Liu N, Zhang J, Yang X, et al. HDM2 Promotes NEDDylation of Hepatitis B Virus HBx To Enhance Its Stability and Function [J]. *J Virol*, 2017, 91(16): e00340-17
- [13] Huang JT, Yang Y, Hu YM, et al. A Highly Sensitive and Robust Method for Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA Detection in Single Cells and Serum [J]. *J Mol Diagn*, 2018, 20(3): 334-343
- [14] Soriano V, Barreiro P, Benitez L, et al. New antivirals for the treatment of chronic hepatitis B [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2017, 26(7): 843-851
- [15] Chong CK, Cheng CYS, Tsoi SYJ, et al. Role of hepatitis B core protein in HBV transcription and recruitment of histone acetyltransferases to cccDNA minichromosome[J]. *Antiviral Res*, 2017, 8(144): 1-7
- [16] Sekiba K, Otsuka M, Ohno M, et al. DHX9 regulates production of hepatitis B virus-derived circular RNA and viral protein levels[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(30): 20953-20964
- [17] Jiao F, Long L, Ding S, et al. Complete genome sequencing and clinical analysis of intrahepatic hepatitis B virus cccDNA from HCC[J]. *Microb Pathog*, 2017, 8(109): 49-55
- [18] Zheng WP, Zhang BY, Shen ZY, et al. Biological effects of bone marrow mesenchymal stem cells on hepatitis B virus in vitro [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(5): 2551-2559
- [19] Wang L, Cao M, Wei QL, et al. A new model mimicking persistent HBV e antigen-negative infection using covalently closed circular DNA in immunocompetent mice [J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175992
- [20] Muto J, Sugiyama M, Shirabe K, et al. Frequency and Characteristics of Occult Hepatitis B Infection Among Hepatocellular Carcinoma Patients in Japan[J]. *Ann Hepatol*, 2018, 17(4): 596-603
- [21] Vyas AK, Jindal A, Hissar S, et al. Immune balance in Hepatitis B Infection: Present and Future Therapies [J]. *Scand J Immunol*, 2017, 86(1): 4-14
- [22] Huang H, Xu C, Zhou X, et al. Incidence and seroprevalence of hepatitis E virus infection in pregnant women infected with hepatitis B virus and antibody placental transfer in infants [J]. *J Clin Virol*, 2016, 9(82): 84-88
- [23] Hensel KO, Cantner F, Bangert F, et al. Episomal HBV persistence within transcribed host nuclear chromatin compartments involves HBx[J]. *Epigenetics Chromatin*, 2018, 11(1): 34
- [24] Muto J, Sugiyama M, Shirabe K, et al. Frequency and Characteristics of Occult Hepatitis B Infection Among Hepatocellular Carcinoma Patients in Japan[J]. *Ann Hepatol*, 2018, 17(4): 596-603
- [25] Arora A, Singh SP, Kumar A, et al. INASL Position Statements on Prevention, Diagnosis and Management of Hepatitis B Virus Infection in India: The Andaman Statements[J]. *J Clin Exp Hepatol*, 2018, 8(1): 58-80
- [26] Huang JT, Yang Y, Hu YM, et al. A Highly Sensitive and Robust Method for Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA Detection in Single Cells and Serum [J]. *J Mol Diagn*, 2018, 20(3): 334-343
- [27] Li Z, Min Q, Huang H, et al. Design, synthesis and biological evaluation of seco-A-pentacyclic triterpenoids-3,4-lactone as potent non-nucleoside HBV inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28(9): 1501-1506
- [28] 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
- [29] Malagnino V, Salpini R, Maffongelli G, et al. High rates of chronic HBV genotype E infection in a group of migrants in Italy from West Africa: Virological characteristics associated with poor immune clearance[J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0195045
- [30] Quinet J, Jamard C, Burtin M, et al. Nucleic acid polymer REP 2139 and nucleoside analogues act synergistically against chronic hepatitis B infection in vivo in Pekin ducks [J]. *Hepatology*, 2018, 67(6): 2127-2140