

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.01.008

# 实时定量 RT-PCR 对乙型肝炎病毒全长 RNA(fRNA)的定量检测 \*

张佳瑞 巩 丽 朱少君 韩秀娟 姚 丽 王姝妹 李艳红<sup>△</sup> 张 伟<sup>△</sup>

(第四军医大学唐都医院病理科 第四军医大学唐都医院妇产科 陕西 西安 710038)

**摘要 目的:**建立一种简便的定量检测慢性乙型肝炎患者血清中终止于聚腺苷酸化位点的乙型肝炎病毒全长 RNA(fRNA)的方法。**方法:**选取 53 例未治疗的乙型肝炎患者及 22 例 HBsAg 阴性的健康者为研究对象,使用锚定 oligo-dT 的引物对其血清中 fRNA 进行实时定量反转录 PCR 检测,统计分析其与 HBV DNA、HBcrAg 和 HBeAg 的相关性。**结果:**对 fRNA 进行实时荧光定量 RT-PCR 检测的下限为 2.3 log copies/ml,标准曲线的相关系数为 0.99( $P<0.0001$ )。53 例乙型肝炎患者中,29 例(54.7%)可以检测到 fRNA,22 例正常对照中没有检测到 fRNA。27 例 HBeAg 阳性和 / 或高水平 HBV DNA 的患者全部检测到 fRNA,26 例 HBeAg 阴性并且低水平 HBV DNA 的乙型肝炎患者中有 2 例 (7.7%) 检测到 fRNA ( $P<0.0001$ )。HBeAg 阳性患者血清中 fRNA 水平高于 HBeAg 阴性患者( $5.0\pm 0.3$  vs.  $2.9\pm 0.4$  log copies/ml,  $P<0.001$ )。fRNA 与 HBV DNA/HBcrAg 具有显著相关性( $r=0.905, 0.881, P<0.0001$ )。Hayashi's 定量分析法 I 显示 fRNA 与 HBV DNA 相关性强于其与 HBcrAg 的相关性。**结论:**与 HBV DNA 和 HBeAg 一样, fRNA 可作为常规检测判断 HBV 的复制水平并指导用药。

**关键词:**HBV RNA; 实时荧光定量; fRNA; Hayashi's 定量法

**中图分类号:**R512.62 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)01-29-04

## Validation of a Simple Real-time RT-PCR for Detection and Quantization of HBV fRNA\*

ZHANG Jia-rui, GONG Li, ZHU Shao-jun, HAN Xiu-juan, YAO Li, WANG Shu-mei, LI Yan-hong<sup>△</sup>, ZHANG Wei<sup>△</sup>

(Department of Pathology, Department of Obstetrics and Gynecology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

**ABSTRACT Objective:** To establish a simple assay for the detection and quantization of full-length RNA (fRNA) terminating at polyadenylation site in sera of chronic hepatitis B (CHB) patients. **Methods:** fRNA were assayed via TaqMan real-time RT/PCR using anchored oligo-dT primers in sera of 53 treatment-naïve CHB patients and 22 HBsAg-negative healthy controls. Results were analyzed by comparison of HBV DNA with HBcrAg and HBeAg. **Results:** The fRNA assay had a lower limit of detection and quantization at 2.3 log copies/ml, and a correlation coefficient of 0.99 ( $P<0.0001$ ). fRNA was detected in 29 of 53 (54.7%) of the CHB patients as compared to non of 22 controls (Specificity). fRNA was detected in all 27 HBeAg-positive and/or high HBV DNA levels CHB patients as compared to 2 of 26 (7.7%) HBeAg-negative and low HBV DNA levels CHB patients ( $P<0.0001$ ). fRNA levels were higher in HBeAg-positive than in HBeAg-negative samples ( $5.0\pm 0.3$  vs.  $2.9\pm 0.4$  log copies/ml,  $P<0.001$ ). Significant correlation was found between fRNA and HBV DNA/ HBcrAg ( $r=0.905$  and  $0.881$ , respectively,  $P<0.0001$ ). The effective items on fRNA levels, in descending order, were: HBV DNA, HBcrAg by means of Hayashi's quantification method type I (Multiple correlation efficient=0.939). **Conclusion:** The simple real-time RT/PCR for detection and quantization of fRNA was suitable for routine clinical test in assessing HBV replication status the same as HBV DNA and HBeAg in CHB patients.

**Key words:** HBV RNA; RT-PCR; fRNA; Hayashi's quantification method

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

**Article ID:** 1673-6273(2015)01-29-04

### 前言

乙型肝炎病毒(HBV)复制过程中最先检测到的复制中间体为一种闭合环状 DNA(cccDNA),被认为是乙肝病毒前基因组转录的模板。HBV 特异的 RNA、单链 DNA 均晚于 cccDNA

合成。以前基因组 RNA 为模板通过逆转录合成的 HBV DNA 负链代表了 HBV DNA 的全部信息。HBV 病毒有 6 个开放阅读框(open reading frame, ORF),即 PreS1/S2(S)编码区、PreC (C) 编码区、P 基因、X 基因以及第 5 和第 6ORF。fRNA 产生于 XDNA,当负链 DNA 形成后即降解<sup>[1,2]</sup>。对 HBV 的常规诊断主

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(30672013);国家自然科学基金项目(81372226);陕西省科技统筹创新工程(2011KTCL03-11)

作者简介:张佳瑞(1987-),女,硕士,医师,主要研究方向:分子病理,E-mail:zhangjia Rui1987@hotmail.com

<sup>△</sup>通讯作者:张伟,E-mail:zhwlyh@fmmu.edu.cn;

李艳红,E-mail:lyhzhw@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2014-08-16 接受日期:2014-09-12)

要是通过对血清中 HBV C 区 DNA 及其基因产物 HBsAg、HBcAg 及 HBeAg 检测进行诊断。

在 HBeAg 阳性并且有较高水平 HBV DNA 乙型肝炎患者及少数 HBeAg 阴性、检测到中等水平 HBV DNA 的乙肝患者血清中均可检测到 fRNA<sup>[3]</sup>。研究表明血清中 HBV RNA 定量检测对于拉米夫定治疗有一定的监测作用<sup>[4-6]</sup>。提取核酸、加入 DNA 酶后使用 RT/PCR 方法对 fRNA 进行检测过于繁杂。本研究探索了一种不需要使用 DNA 酶,通过实时定量反转录 PCR 的方法检测血清中 fRNA,现将结果报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

血清标本来自唐都医院近 13 年的慢性乙型肝炎患者 (25-91 岁,男/女=32/21)和 22 例 HBsAg 阴性的健康人。检测 HBsAg、HBeAg 和 HBeAb 使用商品化试剂盒 Chemiluminescent Enzyme Immunoassay (CLEIA) (Roche, Mannheim, Germany), 检测的下限和上限分别为 2.6 和 7.6 log copies/ml, HBcrAg 通过商品化试剂盒 CLEIA LumipulseR HBcrAg kit 检测 (Fujirebio, Tokyo, Japan), 检测的下限和上限分别为 3.0 and 7.0 log U/ml。

### 1.2 方法

**1.2.1 血清收集及核酸提取** 无 RNA 酶无 DNA 酶试管收集患者血液,低速(1000-2000 g)4℃ 离心取上清,使用高保真病毒核酸提取试剂盒(Roche, Mannheim, Germany)提取核酸。200 μl 血清提取后用 50 μL 洗脱液洗脱。

**1.2.2 fRNA 的检测** Taqman RNA-to-C1TM-Step 试剂盒(Applied Biosystems)通过 TaqMan real-time RT/PCR 检测 fRNA。一步法进行扩增时同义序列 (核苷酸序列 1678-1698, 5'-ACCAGCACCATGCAACTTTT-3')与锚定 Oligo(dT)的引物 (nucleotides 1802-1806a, 5'- (T)15AGCTC-3' or 1804-808a, 5'- (T)15GAAGC-3')结合<sup>[7]</sup>(Zhang W, Hacker HJ, Mildeberger M, Su Q and Schroder CH: Detection of HBV RNA in serum of patients. Methods Mol Med 95: 29-40, 2004.) 使用探针核苷酸 1732-1749, 5'-FAM-ACTGTTCAAGCCTCCAAG-MGB-3')。real-time RT/PCR 体系包括: 2 μL 核酸, 0.5 μL 反转录酶混合液 (包含 ArrayScriptTMUP 反转录酶和 RNA 酶抑制剂), 10 μL 混合液 (包含 AmpliTaq GoldR DNA 聚合酶和 dNTP), 引物各 900 nM, 250 nM 探针, 最终体积 20 μL。扩增程序如下: 48℃ 15 min, 95℃ 10 min, 90℃ 40 sec 40 循环, 53℃ 50, and 70℃ 40 sec。分

别加入去离子水和已知浓度的 fRNA 做为空白对照和阳性对照。另外,通过没有加入反转录酶的 fRNA 阳性质粒监控是否存在 DNA 污染。通过 StepOneTM Software V 2.1 (Applied Biosystems)分析数据。取 fRNA 得 log 值进行统计。统计下线为 2.3 log copies/mL。

**1.2.3 绘制标准曲线, 获取最低检测浓度** 以 10 ng/mL 质粒 pMT9T40A (nucleotide 1434-1808+T15)<sup>[7]</sup>作为阳性对照, 以 1 ng/mL-100 ag/mL 阳性质粒标准品行定量 PCR, 每个浓度做 4 个复孔, 连续做 3 天。根据 12 组拷贝数及 CT 值绘制出标准曲线, 以可以检测出的最低浓度阳性质粒作为系统可以检测到的浓度下线。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 软件进行数据分析。使用 Kruskal-Wallis 和 Spearman's 等级相关性分析进行定性分析; 使用 Student t 检验进行定量分析; 使用 Hayashi's quantification method type I 法进行 fRNA 水平与 HBV DNA 水平相关性分析<sup>[8]</sup>, 以 P<0.05 为差异具有统计学意义的标准。

## 2 结果

### 2.1 可检测的最低浓度

RT-PCR 系统中, 阳性质粒 pMT9T40A 可检测出的最低浓度为 1 copy/5 μL。

### 2.2 标准曲线的建立

以 1 ng/mL-100 ag/mL 质粒扩增, 绘制出 Lg fRNA 与 CT 值标准曲线,  $Y = -1.5949 \ln(x) + 45.135$ ,  $R^2$  为 0.9809。

### 2.3 fRNA 检测的特异性

53 例乙型肝炎患者中, 29 例 (54.7%) 可以检测到 fRNA, 22 例对照中均没有检测到 fRNA。

### 2.4 特异性乙型肝炎患者血清中 fRNA 的检测结果

从表 1 可以看出, 所有的 27 例 HBeAg 阳性和 / 或高水平 HBV DNA (>5 log copies/mL) 乙型肝炎患者都可以检测到 fRNA, 而在 26 例 HBeAg 阴性及低水平 HBV DNA 乙型肝炎患者中, 仅有 2 例检测出 fRNA (7.7%) ( $P < 0.0001$ )。在不加转录酶的情况下, 含有低水平 fRNA (<4.9 log copies/mL) 的样本检测不出 HBV DNA。HBeAg 阳性患者血清中 fRNA 水平高于 HBeAg 阴性患者血清中 fRNA 水平 ( $5.0 \pm 0.3$  vs.  $2.9 \pm 0.4$  log copies/mL,  $P < 0.001$ )。血清中 fRNA 和 HBV DNA / HBcrAg 之间具有显著相关性 ( $r = 0.905$  和  $0.881$ ,  $P < 0.0001$ , 图 1)。

Table 1 Treatment-Naive chronic hepatitis B patient characteristics

| Item                | HBeAg positive (n=21)   |               | HBeAg negative (n=32)   |              |
|---------------------|-------------------------|---------------|-------------------------|--------------|
|                     | HBV DNA (log copies/ml) |               | HBV DNA (log copies/ml) |              |
|                     | >7.6~5.5 (n=21)         | 6.7~5.0 (n=6) | <4.9 (n=26)             | P value*     |
| HBcrAg detected (%) | 21/21 (100)             | 4/6 (66.7)    | 2/26 (7.7)              | $p < 0.0001$ |
| fRNA detected (%)   | 21/21 (100)             | 6/6 (100)     | 2/26 (7.7)              | $p < 0.0001$ |

Note: \*The Kruskal-Wallis was used to analyze qualitative data.

\*100% hit rate at 1 copy/5 μL RT-PCR.

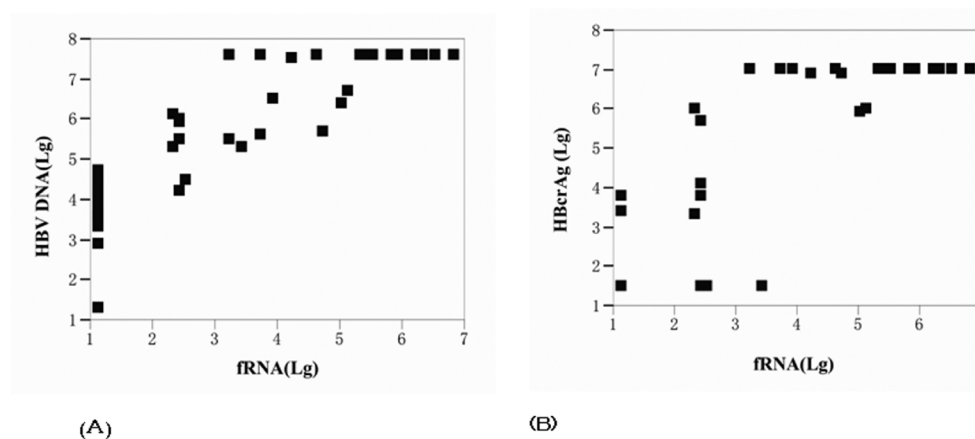


Fig.1 Correlation between fRNA and HBV DNA/ HBcrAg (Scatter-plot) in 21 HBeAg positive and 30 HBeAg negative CHB patients. (A) Correlation between fRNA and HBV DNA. ( $r=0.905$ ,  $P<0.0001$ , Spearman's rank correlation). (B) Correlation between fRNA and HBcrAg ( $r=0.881$ ,  $P<0.0001$ , Spearman's rank correlation)

### 3 讨论

以往的研究使用锚定 oligo(dT)的引物利用 RT/PCR 对 fRNA 的扩增进行检测<sup>[9,10]</sup>,但尚没有通过实时定量 RT/PCR 法对 fRNA 进行定量<sup>[3,9]</sup>。本研究利用简便灵敏的检测方法定量检测乙型肝炎患者血清中 fRNA,采用提纯的 RNA 和 DNA 模板进行扩增。为了检测是否有 DNA 污染,将提纯的样本在不加入反转录酶的情况下观察扩增情况,结果显示不存在 HBV DNA 扩增,提示没有 DNA 污染。对 84.6%样本进行 HBV DNA 测试,结果显示其 HBV DNA 水平低于 fRNA 反转录后的两倍以上,表明样本中 HBV DNA 可以忽略不计。以质粒 pMT9T40A 为阳性对照,并对 PCR 反应浓度进行检测<sup>[7]</sup>,实时定量 RT-PCR 结果显示用此质粒进行扩增具有很好的敏感性、可重复性和较广的检测范围(表 2,图 1)。

所有 HBeAg 阳性乙型肝炎患者的血清中都可检测到 fRNA (表 1),HBeAg 阳性患者体内 fRNA 含量高于 HBeAg 阴性患者。另外,HBV DNA 水平高( $>5.0$  log copies/mL)的乙型肝炎患者血清中均可检测到 fRNA。因此,患者体内 fRNA 水平与 HBV DNA 和 HBcrAg 均呈正相关(图 1)。肝内 cccDNA 作为病毒复制的模板在感染病毒肝组织内持续存在,是 HBV 复制最可靠的标记物<sup>[11,12]</sup>。检测肝组织中 cccDNA 往往比较困难,故人们通过检测血清中与 cccDNA 正相关的 HBV DNA 和 HBcrAg 以反映其水平<sup>[13,14]</sup>。目前,尚没有数据证明 fRNA 和 cccDNA 没有相关性<sup>[15]</sup>,但是其与 HBV DNA/HBcrAg 之间相关性提示 fRNA 和 HBV DNA/HBcrAg 相关。

fRNA 的定量检测可能用于指导抗病毒治疗及预后预测。目前,HBV DNA 及 HBcrAg 水平检测用作抗病毒治疗前的常规检测<sup>[16,17]</sup>。对拉米夫定治疗的乙型肝炎患者进行 fRNA 动态检测,结果显示 fRNA 在拉米夫定成功治疗消除后,由于抗药性突变的形成会重新出现<sup>[18-20]</sup>。

总之,本研究确立了一种简便的检测 fRNA 的定量检测方法。此方法敏感性、可重复性较强,最低检测浓度为 1 copies/5  $\mu$ L(2.3 log copies/mL,可以与 HBV DNA 和 HBeAg 检测一同作为对乙型肝炎患者 HBV 复制情况的检测。

### 参考文献(References)

- [1] Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, et al. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene [J]. *Pathol Biol (Paris)*, 2010, 58(4): 267-272
- [2] Nassal M, Schaller H. Hepatitis B virus replication--an update[J]. *J Viral Hepat*, 1996, 3(5): 217-226
- [3] Su Q, Wang S F, Chang T E, et al. Circulating hepatitis B virus nucleic acids in chronic infection : representation of differently polyadenylated viral transcripts during progression to nonreplicative stages [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(7): 2005-2015
- [4] Huang Y W, Chayama K, Tsuge M, et al. Differential effects of interferon and lamivudine on serum HBV RNA inhibition in patients with chronic hepatitis B[J]. *Antivir Ther*, 2010, 15(2): 177-184
- [5] Hatakeyama T, Noguchi C, Hiraga N, et al. Serum HBV RNA is a predictor of early emergence of the YMDD mutant in patients treated with lamivudine[J]. *Hepatology*, 2007, 45(5): 1179-1186
- [6] Sokal E. Lamivudine for the treatment of chronic hepatitis B[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2002, 3(3): 329-339
- [7] Zhang W, Hacker H J, Mildenerberger M, et al. Detection of HBV RNA in serum of patients[J]. *Methods Mol Med*, 2004, 95: 29-40
- [8] Tanaka Y. Review of the methods of quantification[J]. *Environ Health Perspect*, 1979, 32: 113-123
- [9] Kairat A, Beerheide W, Zhou G, et al. Truncated hepatitis B virus RNA in human hepatocellular carcinoma: its representation in patients with advancing age[J]. *Intervirology*, 1999, 42(4): 228-237
- [10] Schutz T, Kairat A, Schroder C H. Anchored oligo (dT) primed RT/PCR: identification and quantification of related transcripts with distinct 3'-ends[J]. *J Virol Methods*, 2000, 86(2): 167-171
- [11] Wang Q, Fiel M I, Luan W, et al. Impact of intrahepatic hepatitis B DNA and covalently closed circular DNA on survival after hepatectomy in HBV-associated hepatocellular carcinoma patients [J]. *Ann Surg Oncol*, 2013, 20(12): 3761-3770
- [12] Li H, Tang H. On the detection of HBV cccDNA and its clinical significance: an overview of research advancement [J]. *Journal of Biomedical Engineering*, 2009, 26(3): 662-666
- [13] Chen L, Zheng C X, Lin M H, et al. The impact of early rapid virological response on the outcomes of hepatitis B associated acute on

- chronic liver failure during antiviral treatment [J]. Chinese Journal of Hepatology, 2011, 19(10): 734-737
- [14] Suzuki F, Miyakoshi H, Kobayashi M, et al. Correlation between serum hepatitis B virus core-related antigen and intrahepatic covalently closed circular DNA in chronic hepatitis B patients [J]. J Med Virol, 2009, 81(1): 27-33
- [15] Takkenberg R B, Zaaijer H L, Molenkamp R, et al. Validation of a sensitive and specific real-time PCR for detection and quantitation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in plasma of chronic hepatitis B patients[J]. J Med Virol, 2009, 81(6): 988-995
- [16] Imazeki F, Wu S, Arai M, et al. HBeAg and HBV DNA in chronic hepatitis B[J]. Nihon Rinsho, 2011, 69(Suppl 4): 428-433
- [17] Yalamanchili N, Syed R, Chandra M, et al. A latest and promising approach for prediction of viral load in hepatitis B virus infected patients[J]. Indian J Hum Genet, 2011, 17(1): 17-21
- [18] Zhang W, Li Y H, Zhu S J, et al. Hepatitis B virus X-DNA. A serum marker for early detection of resistance development during lamivudine therapy[J]. Ann N Y Acad Sci, 2008, 1137: 264-272
- [19] Breitskreutz R, Zhang W, Lee M, et al. Hepatitis B virus nucleic acids circulating in the blood: distinct patterns in HBs carriers with hepatocellular carcinoma[J]. Ann N Y Acad Sci, 2001, 945: 195-206
- [20] Zhang S, Wang S, Wang Y. Inhibition of hepatitis B virus replication in vitro by phosphorothioate and tetradecyl phosphorothioate analogs of antisense oligonucleotide directed against precore and core regions[J]. Chinese Journal of Internal Medicine, 1996, 35(2): 95-98

(上接第 17 页)

- [14] Zhou Y, Cao S, Wang Y, et al. Berberine metabolites could induce low density lipoprotein receptor up-regulation to exert lipid-lowering effects in human hepatoma cells[J]. Fitoterapia, 2014, 92: 230-237
- [15] Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders [J]. Nature, 2006, 444(7121): 860-867
- [16] Sinha-Hikim, Sinha-Hikim AP, Shen R, et al. A novel cystine based antioxidant attenuates oxidative stress and hepatic steatosis in diet-induced obese mice[J]. Exp Mol Pathol, 2011, 91(1): 419-428
- [17] 晏贤春, 胡彬, 王赫, 等. 游离脂肪酸诱导小鼠肝实质细胞体外脂肪化并加速细胞凋亡[J]. 肝脏, 2013, 18(5): 306-309
- Yan Xian-chun, Hu Bin, Wang He, et al. FFAs induced mice hepatocytes to lipid accumulation and accelerated apoptosis in vitro[J]. Chinese Hepatology, 2013, 18(5): 306-309
- [18] Rottiers V, Naar AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(4): 239-250
- [19] Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship [J]. Nat Rev Genet, 2012, 13(4): 271-282
- [20] Sacco J, Adeli K. MicroRNAs: emerging roles in lipid and lipoprotein metabolism[J]. Curr Opin Lipidol, 2012, 23(3): 220-225
- [21] Ceccarelli S, Panera N, Gnani D, et al. Dual Role of MicroRNAs in NAFLD[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(4): 8437-8455
- [22] Esau C, Davis S, Murray SF, et al. MiR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting [J]. Cell Metab, 2006, 3(2): 87-98
- [23] Iliopoulos D, Drosatos K, Hiyama Y, et al. MicroRNA-370 controls the expression of microRNA-122 and Cpt1alpha and affects lipid metabolism[J]. J Lipid Res, 2010, 51(6): 1513-1523
- [24] Monetti M, Levin MC, Watt MJ, et al. Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver[J]. Cell Metab, 2007, 6(1): 69-78
- [25] Cheung O, Puri P, Eicken C, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression [J]. Hepatology, 2008, 48(6): 1810-1820