

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.16.004
文章编号: 1005-8982 (2023) 16-0020-05

肝疾病专题·论著

慢性乙型肝炎患者长期核苷酸类似物抗病毒 治疗后血清HBV pgRNA检出率及与 血清学抗原状态的相关性*

黄健, 李定富, 王恒月

(海南西部中心医院 检验科, 海南 儋州 571799)

摘要: **目的** 分析慢性乙型肝炎患者长期核苷酸类似物抗病毒治疗后血清乙型肝炎病毒前基因组RNA (HBV pgRNA) 的检出率及与血清学抗原状态的相关性。**方法** 选取2020年7月—2022年7月在海南西部中心医院接受长期核苷酸类似物抗病毒治疗的150例慢性乙型肝炎患者, 根据乙型肝炎e抗原 (HBeAg) 状态将其分为HBeAg阳性组(32例)、HBeAg阴性组(118例), 再根据乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 水平高低将HBeAg阴性组患者分为4组, 其中HBsAg > 1 500 IU/mL患者32例(A组), HBsAg > 100 ~ 1 500 IU/mL患者32例(B组), HBsAg ≤ 100 IU/mL患者32例(C组), HBsAg阴性患者22例(D组)。比较不同抗原状态下HBV pgRNA的检出率, 分析HBV pgRNA与血清学抗原状态的相关性。**结果** HBeAg阳性组血清HBV pgRNA检出率(93.8%)高于HBeAg阴性组(43.2%) ($P < 0.05$)。A、B组血清HBV pgRNA检出率(78.1%和65.6%)均高于C、D组(15.6%和0.00%) ($P < 0.05$)。**结论** 慢性乙型肝炎患者长期核苷酸类似物抗病毒治疗后血清HBV pgRNA检出率与血清学抗原 (HBsAg、HBeAg) 状态有相关性, HBV pgRNA可作为判断慢性乙型肝炎患者长期核苷酸类似物抗病毒治疗后肝内HBV cccDNA转录活性及复制状态的生物标志物。

关键词: 慢性乙型肝炎; 核苷酸类似物; HBV pgRNA; 乙型肝炎表面抗原; 乙型肝炎e抗原

中图分类号: R512.62

文献标识码: A

Detection rate of serum HBV pgRNA and its relationship with serological status of HBV antigens in patients receiving long-term antiviral treatment with nucleotides analogues for chronic hepatitis B*

Huang Jian, Li Ding-fu, Wang Heng-yue

(Department of Clinical Laboratory, Hainan Western Central Hospital, Danzhou, Hainan 571799, China)

Abstract: **Objective** To analyze the detection rate of serum hepatitis B virus (HBV) pregenomic RNA (HBV pgRNA) and its relationship with serological status of HBV antigens in patients receiving long-term antiviral treatment with nucleotides analogues for chronic hepatitis B. **Methods** A total of 150 patients with chronic hepatitis B who received long-term antiviral treatment with nucleotide analogues in our hospital from July 2020 to July 2022 were selected and divided into HBeAg positive group ($n = 32$) and HBeAg negative group ($n = 118$) based on the serological status of hepatitis B e antigen (HBeAg). According to the level of hepatitis B surface antigen (HBsAg), the patients were divided into four groups, including 32 patients with HBsAg > 1 500 IU/mL in group A, 32 patients with $100 \text{ IU/mL} < \text{HBsAg} \leq 1 500 \text{ IU/mL}$ in group B, 32 patients with HBsAg ≤ 100 IU/mL in group C, and 22 patients with negative HbsAg in group D. The detection rate of HBV pgRNA was compared among patients with

收稿日期: 2023-05-21

* 基金项目: 海南省自然科学基金(No:820MS154)

different serological status of HBV antigens, and the relationship between the presence of HBV pgRNA and serological status of HBV antigens was analyzed. **Results** The detection rate of serum HBV pgRNA in HBeAg positive group (93.8%) was higher than that in HBeAg negative group (43.2%) ($P < 0.05$). The detection rates of serum HBV pgRNA in groups A and B (78.1% and 65.6%) were higher than those in groups C and D (15.6% and 0.00%) ($P < 0.05$). **Conclusions** The detection rate of serum HBV pgRNA after long-term antiviral treatment with nucleotides analogues for chronic hepatitis B is correlated with the serological status of HBV antigens (such as HbsAg and HBeAg). HBV pgRNA can be established as a biomarker to determine the transcription activity and replication status of intrahepatic HBV cccDNA after long-term antiviral treatment with nucleotides analogues for chronic hepatitis B.

Keywords: chronic hepatitis B; nucleotide analogues; HBV pgRNA; hepatitis B surface antigen; hepatitis B e antigen

慢性乙型肝炎由乙型肝炎病毒 (hepatitis B, HBV) 感染所致, 临床表现为乏力、畏食、恶心、腹胀、肝区疼痛等症状, 可进展为肝衰竭、肝硬化、肝癌等终末期肝病, 严重威胁人类的身体健康和生命安全^[1]。核苷酸类似物具有抗病毒作用强、安全性好、口服方便等特点, 广泛用于慢性乙型肝炎的治疗, 长期用药可延缓病情进展^[2]。慢性乙型肝炎治疗的关键是清除肝细胞内的共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA), 因此 HBV cccDNA 的数量及转录活性是评估 HBV 复制状态及抗病毒治疗效果的可靠指标^[3]。乙型肝炎病毒前基因组 RNA (hepatitis B virus pregenomic RNA, HBV pgRNA) 是 HBV 复制的中间产物, 在 HBV 复制周期中, HBV cccDNA 利用宿主感染肝细胞的转录系统产生 HBV pgRNA, 因此 HBV pgRNA 能较好地反映 HBV cccDNA 在肝脏中的状态^[4]。有研究表明, HBV pgRNA 的表达更能反映 HBV 复制状态, 经抗病毒治疗后, 乙型肝炎 e 抗原 (hepatitis B e antigen, HBeAg) 可获得持久的血清学转换, 使乙型肝炎表面抗原 (hepatitis B surface antigen, HBsAg) 水平下降, 意味着患者病情有所好转, 但并不代表病毒已经被完全清除^[5]。目前, 关于慢性乙型肝炎抗病毒治疗后 HBV pgRNA 如何变化, 以及其与血清学抗原状态的关系尚未见报道。本研究旨在分析慢性乙型肝炎患者长期核苷酸类似物抗病毒治疗后血清 HBV pgRNA 的检出率及与血清学抗原状态的关系, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2020 年 7 月—2022 年 7 月在海南西部中心

医院接受长期核苷酸类似物抗病毒治疗的 150 例慢性乙型肝炎患者。其中, 男性 95 例, 女性 55 例; 年龄 25 ~ 60 岁, 平均 (38.27 ± 5.96) 岁。根据 HBeAg 状态将患者分为 HBeAg 阳性组 (32 例)、HBeAg 阴性组 (118 例), 再根据 HBsAg 水平高低将 HBeAg 阴性组患者分为 4 组, 其中 HBsAg > 1 500 IU/mL 患者 32 例 (A 组), HBsAg > 100 ~ 1 500 IU/mL 患者 32 例 (B 组), HBsAg ≤ 100 IU/mL 患者 32 例 (C 组), HBsAg 阴性患者 22 例 (D 组), 进行回顾性研究。本研究经医院医学伦理委员会批准, 患者及家属均签署知情同意书。

1.2 纳入与排除标准

1.2.1 纳入标准 ①符合《慢性乙型肝炎基层诊疗指南 (2020 年)》^[6]中有关诊断标准; ②接受核苷酸类似物抗病毒治疗 2 年, HBV DNA < 20 IU/mL; ③无糖尿病、高血压等基础性疾病。

1.2.2 排除标准 ①合并其他病毒性肝炎、药物性肝损伤、免疫性肝病; ②合并严重感染; ③既往应用过干扰素等会影响血清学抗原指标的药物。

1.3 检测方法

所有患者予以核苷酸类似物抗病毒治疗, 口服恩替卡韦、替诺福韦或阿德福韦酯, 连续治疗 2 年, 血清 HBV DNA 转阴者, 判定为获得持续病毒学应答; 若 HBsAg 和/或 HBeAg 连续 24 周无明显变化, 则停止治疗。采集患者清晨空腹外周静脉血 3 mL, 3 000 r/min 离心 5 min, 分离血清, 采用实时荧光定量聚合酶链反应检测血清 HBV pgRNA。取血清 250 μL, 采用磁珠法提取 HBV RNA, 检测 RNA 的质量和浓度, 使用实时荧光定量 PCR 仪 (上海宏石医疗科技有限公司, 型号: SLAN 96P) 进行逆转录和扩增: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s,

72 ℃延伸2 min,共40个循环。试剂盒由广州海力特生物科技有限公司提供。采用化学发光免疫分析仪(美国罗氏公司,型号:Cobas 6000)定量检测HBsAg、定性检测HBeAg,试剂盒由美国雅培公司提供。

1.4 统计学方法

数据分析采用SPSS 26.0统计软件。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用 t 检验;计数资料以例(%)表示,比较用 χ^2 检验;相关性分析用Pearson法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HBeAg 阳性组与 HBeAg 阴性组血清 HBV pgRNA 检出率比较

32例HBeAg阳性组患者中30例检出HBV pgRNA,检出率为93.8%;118例HBeAg阴性组患者中51例检出HBV pgRNA,检出率为43.2%。两组血清HBV pgRNA检出率比较,经 χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2=25.875, P=0.000$),HBeAg阳性组血清HBV pgRNA检出率高于HBeAg阴性组($P < 0.05$)。

2.2 不同抗原状态下血清HBV pgRNA检出率比较

32例A组患者中25例检出HBV pgRNA,检出率为78.1%;32例B组患者中21例检出HBV pgRNA,检出率为65.6%;32例C组患者中5例检出HBV pgRNA,检出率为15.6%;22例D组患者中均未检出HBV pgRNA。4组血清HBV pgRNA检出率比较,经 χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2=49.108, P=0.000$);与A组比较,C、D组血清HBV pgRNA检出率低($\chi^2=25.098$ 和 32.004 ,均 $P=0.000$);与B组比较,C、D组血清HBV pgRNA检出率低($\chi^2=16.583$ 和 23.625 ,均 $P=0.000$)。

2.3 血清HBV pgRNA检出率与血清学抗原的相关性

Pearson相关性分析结果表明,血清HBV pgRNA检出率与血清学抗原(HBsAg、HBeAg)均呈正相关($r=0.805$ 和 $0.824, P=0.001$ 和 0.000)。

3 讨论

慢性乙型肝炎是全球范围内严重危害人类健康的传染性疾病,主要通过性接触、母婴、血液等途径传播;随着疾病进展,患者肝细胞出现不同程度

的损伤,可能发展为肝纤维化,继而发展为肝硬化或合并肝癌,对患者的生命安全构成极大威胁^[7-8]。临床中,慢性乙型肝炎的主要治疗方式有核苷酸类似物、干扰素或聚乙二醇化干扰素,其中核苷酸类似物抗病毒治疗可以有效控制HBV DNA水平。近年来研究表明,HBV pgRNA的表达更能反映HBV复制状态,核苷酸类似物介导的HBV聚合酶通过阻止HBV pgRNA逆转录,生成松弛环状的双链DNA(relaxed circularDNA, rcDNA)来阻止HBV复制,从而降低肝纤维化、肝硬化、肝癌发生风险^[9]。但有研究表明,核苷酸类似物并不能直接作用于HBV cccDNA,也即无法完全抑制HBV cccDNA表达及活性,具有转录活性的HBV cccDNA仍可继续生成HBV pgRNA,只有当HBV cccDNA耗竭或处于转录沉默状态时才会停止转录^[10]。

长期以来,在外周血中寻找能够有效反映HBV cccDNA转录活性,同时能够评估抗病毒药物治疗效果的生物标志物是医学研究领域的重大难题。在HBV的感染过程中,血清HBV RNA水平会发生相应变化,其可作为预测慢性乙型肝炎疾病进程的生物标志物。HBV pgRNA是HBV cccDNA复制启动后的第一个RNA,其合成不受核苷酸类似物的影响,可用来反映肝细胞内HBV cccDNA的转录活性和复制能力^[11]。HBV感染期间,病毒颗粒通过牛磺胆酸钠共转运多肽或硫酸乙酰肝素蛋白多糖受体侵入细胞,脱去表面抗原后,HBV基因组进入细胞核,形成cccDNA,指导病毒RNA转录。在RNA转录物中,pgRNA通过聚合酶的逆转录酶活性进一步逆转录到rcDNA基因组,与细胞膜中的HBsAg相互作用,作为病毒蛋白质和病毒DNA合成的模板,参与病毒生命周期的调节功能,在慢性乙型肝炎的发展中发挥作用^[12-13]。

既往有研究表明,慢性乙型肝炎患者的抗病毒治疗效果受到血清学抗原状态的影响,血清HBV pgRNA水平可以作为血清学标志物来预测HBeAg阳性患者在抗病毒治疗过程中的血清学应答,HBV pgRNA的动态变化与发生HBeAg血清转换有关^[14]。本研究结果显示,HBeAg阳性组血清HBV pgRNA检出率高于HBeAg阴性组,提示血清HBV pgRNA检出率与发生HBeAg血清转换有关,该结论与卢艳玲等^[15]研究较为相似。上述结果意味着,即使经过

长期核苷酸类似物抗病毒治疗,仍有部分慢性乙型肝炎患者未发生 HBeAg 血清转换,其原因可能在于患者肝内 HBV cccDNA 的转录活性仍较为活跃,复制能力仍然存在,发生 HBeAg 血清转换较为困难^[16]。

有研究报道,慢性乙型肝炎患者血清 HBsAg 水平与肝细胞内 HBV cccDNA 的转录状态密切相关,血清 HBsAg 水平在一定程度上能够反映肝细胞内 HBV cccDNA 的清除情况,血清 HBsAg 的消失被认为是慢性乙型肝炎功能性治愈的标准,即接受一段时间抗病毒治疗检测不到血清 HBV DNA 和 HBsAg,且肝损伤得到修复,肝细胞癌发生风险降低^[17]。本研究结果表明,A、B 组血清 HBV pgRNA 检出率均高于 C、D 组,提示血清 HBV pgRNA 检出率与血清 HBsAg 水平高低有关。饶希等^[18]研究显示,HBeAg 阴性且 HBsAg 低水平患者血清 HBV pgRNA 检出率较低,为本研究所得结论提供了佐证。其原因可能为血清 HBsAg 低表达是由于宿主整合 HBV DNA 的转录翻译,而非肝细胞内 cccDNA 转录来源,此时患者肝细胞内 HBV cccDNA 转录活性处于非活跃状态,HBV 复制趋于静止或沉默状态^[19-20]。

综上所述,慢性乙型肝炎患者长期核苷酸类似物抗病毒治疗后血清 HBV pgRNA 检出率与血清学抗原(HBsAg、HBeAg)状态有相关性,可将 HBV pgRNA 作为判断慢性乙型肝炎患者长期核苷酸类似物抗病毒治疗后肝内 HBV cccDNA 转录活性及复制状态的生物标志物。但本研究也存在一定的局限性,例如研究性质为回顾性,病例数较少、未进行随访等,在患者选择上可能存在偏倚;另外,关于血清 HBV pgRNA 的动态变化对临床指导核苷酸类似物停药是否具有意义等问题并未涉及,后续仍需要更多深入研究进一步验证。

参 考 文 献 :

- [1] CORNBERG M, LOK A S F, TERRAULT N A, et al. Guidance for design and endpoints of clinical trials in chronic hepatitis B - report from the 2019 EASL-AASLD HBV Treatment Endpoints Conference[J]. *J Hepatol*, 2020, 72(3): 539-557.
- [2] CHEN C H, HUNG C H, WANG J H, et al. Long-term incidence and predictors of hepatitis B surface antigen loss after discontinuing nucleoside analogues in noncirrhotic chronic hepatitis B patients[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2018, 24(9): 997-1003.
- [3] SAEED U, KIM J, PIRACHA Z Z, et al. Parvulin 14 and parvulin 17 bind to HBx and cccDNA and upregulate hepatitis B virus replication from cccDNA to virion in an HBx-dependent manner[J]. *J Virol*, 2019, 93(6): e01840-18.
- [4] 杜波,高小丽,白雪梅.慢性乙型肝炎患者HBV-DNA载量与血清microRNA-122、ALT的相关性研究[J].*中国现代医学杂志*, 2020, 30(24): 86-90.
- [5] JENG W J, CHEN Y C, CHIEN R N, et al. Incidence and predictors of hepatitis B surface antigen seroclearance after cessation of nucleos(t)ide analogue therapy in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B[J]. *Hepatology*, 2018, 68(2): 425-434.
- [6] 中华医学会,中华医学会杂志社,中华医学会全科医学分会,等.慢性乙型肝炎基层诊疗指南(2020年)[J].*中华全科医师杂志*, 2021, 20(2): 137-149.
- [7] LUO H, TAN N, KANG Q, et al. Hepatitis B virus pregenomic RNA status can reveal the long-term prognoses of chronic hepatitis B patients treated with nucleos(t)ide analogues[J]. *J Viral Hepat*, 2020, 27(3): 323-328.
- [8] BUTLER E K, GERSCH J, MCNAMARA A, et al. Hepatitis B virus serum DNA and RNA levels in nucleos(t)ide analog-treated or untreated patients during chronic and acute infection[J]. *Hepatology*, 2018, 68(6): 2106-2117.
- [9] JANG T Y, WEI Y J, LIU T W, et al. Role of hepatitis D virus infection in development of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B patients treated with nucleotide/nucleoside analogues[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 8184.
- [10] KIRINO S, TAMAKI N, KUROSAKI M, et al. Dynamic evaluation of hepatocellular carcinoma prediction models in patients with chronic hepatitis B receiving nucleotide/nucleoside analogue treatment[J]. *J Viral Hepat*, 2021, 28(5): 787-794.
- [11] LARAS A, PAPTAEODORIDI M, PANOPOULOU E, et al. Serum hepatitis B virus RNA detectability, composition and clinical significance in patients with *Ab initio* hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B[J]. *J Virol*, 2022, 19(1): 22.
- [12] WU I C, LIU W C, CHIU Y C, et al. Clinical implications of serum hepatitis B virus pregenomic RNA kinetics in chronic hepatitis B patients receiving antiviral treatment and those achieving HBsAg loss[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(6): 1146.
- [13] TESTONI B, LEBOSSE F, SCHOLTES C, et al. Serum hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) correlates with covalently closed circular DNA transcriptional activity in chronic hepatitis B patients[J]. *J Hepatol*, 2019, 70(4): 615-625.
- [14] CAREY I, GERSCH J, WANG B, et al. Pregenomic HBV RNA and hepatitis B core-related antigen predict outcomes in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients suppressed on nucleos(t)ide analogue therapy[J]. *Hepatology*, 2020, 72(1): 42-57.
- [15] 卢艳玲,李小红,陈海涛.慢性乙型肝炎患者血清HBV pgRNA与HBV DNA和HBeAg水平变化关系研究[J].*肝脏*, 2022, 27(3): 302-304.

- [16] LUO M Q, ZHOU B, HOU J L, et al. Biomarkers for predicting nucleos(t)ide analogs discontinuation and hepatitis B virus recurrence after drug withdrawal in chronic hepatitis B patients[J]. *Hepatol Res*, 2022, 52(4): 337-351.
- [17] LE BERT N, GILL U S, HONG M, et al. Effects of hepatitis B surface antigen on virus-specific and global T cells in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *Gastroenterology*, 2020, 159(2): 652-664.
- [18] 饶希, 施欢欢, 吴振平, 等. 长期核苷酸类似物治疗的慢性乙型肝炎患者血清 HBV pgRNA 与抗原状态变化的相关性研究[J]. *中华肝脏病杂志*, 2021, 29(8): 766-770.
- [19] MAK L Y, HUANG Q, WONG D K H, et al. Residual HBV DNA and pgRNA viraemia is associated with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B patients on antiviral therapy[J]. *J Gastroenterol*, 2021, 56(5): 479-488.
- [20] 张国顺, 孟冬梅, 方正亚, 等. HBeAg 阳性与阴性乙型肝炎肝硬化患者乙肝病毒载量及肝功能指标的研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2018, 28(16): 48-51.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 黄健, 李定富, 王恒月. 慢性乙型肝炎患者长期核苷酸类似物抗病毒治疗后血清 HBV pgRNA 检出率及与血清学抗原状态的相关性[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(16): 20-24.

Cite this article as: HUANG J, LI D F, WANG H Y. Detection rate of serum HBV pgRNA and its relationship with serological status of HBV antigens in patients receiving long-term antiviral treatment with nucleotides analogues for chronic hepatitis B[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(16): 20-24.