

乙型肝炎病毒 RNA 在慢性乙型病毒性肝炎 不同 HBeAg 状态下的临床研究

张晓晶, 武瑞, 黄伟, 刘雁, 吴晓瑛, 刘寿荣

杭州市西溪医院(杭州市第六人民医院)肝病科, 浙江 310023

摘要: 目的 通过观察 HBeAg 不同状态下慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)的 HBV RNA 表达水平、检出率分析以及 HBV DNA、HBsAg 的相关性, 探索血清 HBV RNA 在 CHB 管理中的价值。方法 本研究共纳入 2021 年 1 月—12 月在杭州市西溪医院门诊及住院部就诊的 CHB 患者 253 例, 包括 HBeAg 阳性的患者 103 例和 HBeAg 的阴性患者 150 例, 检测血清 HBV RNA 定量, 并分析其与 HBsAg、HBV DNA 等的相关性。结果 在 HBeAg 阳性组与 HBeAg 阴性组之间, HBV RNA 及 HBV DNA 的表达水平, 差异均有统计学意义($P < 0.001$)。HBeAg 阳性患者的 HBV RNA、HBV DNA、HBsAg、ALT、AST 定量均高于 HBeAg 阴性患者。HBeAg 阳性组中, 血清 HBV RNA 与 HBV DNA、HBsAg 成正相关(r 值分别为 0.855、0.669, $P < 0.001$); HBeAg 阴性组中, 血清 HBV RNA 与 HBV DNA、HBsAg 成正相关(r 值分别为 0.476、0.375, $P < 0.001$)。在 CHB 未治患者中 HBV RNA 与 HBsAg、HBV DNA 成正相关(r 值分别为 0.779、0.918, $P < 0.001$)。CHB 经治患者中, HBV RNA 与 HBsAg 成正相关($r = 0.306$, $P < 0.001$)。结论 血清 HBV RNA 与 HBsAg、HBV DNA 具有相关性, 这种相关性在 HBeAg 阳性患者中要优于 HBeAg 阴性患者, 慢性乙型肝炎未治患者中要优于慢性乙型肝炎经治患者; HBeAg 阳性患者的病毒水平及肝功能异常率更高。

关键词: 慢性乙型肝炎; HBV RNA 定量; HBV DNA 定量; HBsAg 定量

中图分类号: R512.6+2 文献标识码: A 文章编号: 1004-8685(2023)03-0257-04

Clinical study of hepatitis B virus RNA in different HBeAg states in chronic hepatitis B

ZHANG Xiao-jing, WU Rui, HUANG Wei, LIU Yan, WU Xiao-ying, LIU Shou-rong

Department of Liver Disease, Hangzhou Xixi Hospital (Hangzhou Sixth People's Hospital), Zhejiang 310023, China

Abstract: Objective The value of serum HBV RNA in chronic hepatitis B (CHB) management was explored by observing the expression level and detection rate of HBV RNA in CHB under different states of HBeAg and the correlation with HBV DNA and HBsAg. **Methods** A total of 253 CHB patients, including 103 HBeAg-positive patients and 150 HBeAg-negative patients, who were admitted to the outpatient and inpatient departments of Hangzhou Xixi Hospital from January 2021 to December 2021, were included in this study. Serum HBV RNA quantification was detected and its correlation with HBsAg and HBV DNA was analyzed. **Results** The level differences of HBV RNA and HBV DNA were statistically significant between HBeAg-positive group and HBeAg-negative group ($P < 0.001$). The quantifications of HBV RNA, HBV DNA, HBsAg, ALT and AST in HBeAg-positive patients were higher than those in HBeAg-negative patients. In HBeAg positive group, serum HBV RNA was positively correlated with HBV DNA and HBsAg ($r = 0.855$, $r = 0.669$, $P < 0.001$). In HBeAg negative group, serum HBV RNA was correlated with HBV DNA and HBsAg ($r = 0.476$, $r = 0.375$, $P < 0.001$), but not as positively as HBeAg positive group. HBV RNA was positively correlated with HBsAg and HBV DNA in patients without CHB treatment ($r = 0.779$, $r = 0.918$, $P < 0.001$). HBV RNA was positively correlated with HBsAg in CHB treated patients ($r = 0.306$, $P < 0.001$). **Conclusion** Serum HBV RNA is significantly correlated with HBsAg and HBV DNA, which is better in HBeAg-positive patients than that in HBeAg-negative patients, and better in untreated patients than that in treated patients. HBeAg-positive patients had higher viral levels and abnormal rate of liver function.

Keywords: Chronic hepatitis B; HBV RNA quantification; HBV DNA quantification; HBsAg quantification

基金项目: 国家“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项“十三五”计划(2017ZX10302201); 国家科技重点研发专项(2018YFC1705700); 杭州市科技计划引导项目(20201231Y040)

作者简介: 张晓晶(1989-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事肝病、感染等方面的工作。

通信作者: 刘寿荣, E-mail: lsr85463990@126.com

慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是重要的公共卫生问题, 极大程度地威胁着人们的生命财产安全^[1]。慢性乙型肝炎病毒感染患者具有很高的进展性肝纤维化、肝硬化甚至肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的风险。HBV 侵入肝细胞后, 形成共价闭合环状 DNA(covalently closed circular

DNA, cccDNA) 是病毒复制的开始和持续 HBV 感染的关键因素^[2]。血清 HBV DNA 的消失仅仅代表了病毒逆转录的过程被有效抑制,并不能反映 cccDNA 的转录活跃状态。有研究表明,尽管慢性乙型肝炎患者血清中 HBV DNA 为低浓度状态,但体内 cccDNA 仍复制活跃,且其肝脏组织学证据仍提示有炎症及纤维化倾向^[3]。

现有的血清标志物和病毒学复制分子学检测难以准确反应肝细胞内 cccDNA 的存在状态,因此很难实现 CHB 的临床治愈,需要长期甚至终生服药。肝组织内 cccDNA 活性是临床上评价治疗效果和“临床治愈”的重要指标^[4]。但 cccDNA 检测需要肝组织穿刺活检,限制了其在临床上的广泛应用,而目前用于监测抗 HBV 疗效的指标如 HBV 表面抗原(HBsAg)、HBVe 抗原(HBeAg)和 HBV DNA 很难精确地反映病情进展和预后。因此目前亟需一种替代性的、能够真实反映肝组织内 cccDNA 活性的病毒学指标。血清 HBV RNA 为 3.5 kb 的前基因组 RNA (pregenomic RNA, pgRNA),以感染肝细胞内的 cccDNA 为模板反转录产生,能反映肝组织 cccDNA 活性,亦与 HBV 复制、感染状态、预测病毒学应答和血清学转换等密切相关^[5]。本项研究拟通过观察 HBeAg 不同状态下 CHB 的 HBV RNA 表达水平、检出率分析以及与 HBV DNA、HBsAg 的相关性,探索血清 HBV RNA 在 CHB 管理中的价值。

1 资料与方法

1.1 资料 本研究共纳入 2021 年 1 月—12 月在杭州市西溪医院门诊及住院部就诊的 CHB 患者 253 例,包括 HBeAg 阳性患者 103 例和 HBeAg 阴性患者 150 例。本研究项目已经获得医院伦理委员会的批准。诊断符合 2019 年中华医学会肝病学会制定的《慢性乙型肝炎防治指南》^[6]。排除标准:(1) 妊娠期以及哺乳期的女性;(2) 合并其他肝炎的患者(如甲型、丙型、丁型、戊型病毒性肝炎,艾滋病病毒性肝炎、酒精性肝病、药物性肝炎、自身免疫性肝病等);(3) 合并有严重器质性疾病,包括未被控制的原发性心脏、肾脏、肺脏、消化性、血管性、神经性、代谢性疾病(如甲亢,不能控制的糖尿病、肾上腺的疾病,以及精神分裂症等);(4) 近 6 个月正在接受皮质醇类固醇药物或者免疫抑制剂者。

1.2 方法

1.2.1 血清 HBV RNA 的检测 本研究的血清 HBV RNA 检测是使用乙型肝炎病毒核酸测定的试剂盒(由中国上海仁度生物科技股份有限公司提供)使用 RNA 捕获探针法,本检测主要分为核酸捕获以及实时荧光核酸恒温扩增检测。核酸捕获主要是通过病毒核酸提取液中的磁性颗粒来特异性捕获靶标 RNA,实

时荧光核酸恒温扩增检测(simultaneous amplification and testing, SAT) 是一种 RNA 转录扩增的同时使用探针实时检测的方法。HBV RNA < 50 copies/ml 为阴性。

1.2.2 血清 HBV DNA 的检测 本研究的血清 HBV DNA 检测是采用乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒,在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪上行 HBV DNA 检测。使用血清样本经裂解液裂解细胞后,通过磁珠与 DNA 分子特异性地识别及高效结合,然后利用磁性分离器使磁珠吸附于管壁,通过洗涤、洗脱以及纯化后得到高纯度的 DNA。HBV DNA < 30 IU/ml 为阴性。

1.2.3 血清 HBV 标志物的检测 本研究血清 HBV 标志物的检测,是应用化学发光免疫分析法在美国雅培 Alinity i 全自动化学发光免疫分析仪上检测,HBsAg 定量 < 0.05 IU/ml 判断为阴性,对于 HBsAg 检测值 > 250 IU/ml 的样本,采用 1:50 标准液稀释,混匀后再上机检测;HBeAg < 1S/CO 为阴性。

1.2.4 肝功能的检测 肝功能的检测采用的是 Beckman Coulter AU5831 全自动生化分析仪检测谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT),谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST); ALT 正常值为 9 U/L ~ 50 U/L, AST 正常值为 15 U/L ~ 40 U/L。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料用均数 ± 标准差来进行描述,组间比较采用 Kruskal - Wallis 检验。变量资料 2 组间的比较采用 χ^2 检验,连续性定量资料 2 组间的比较,如数据满足正态分布且方差齐性时采用 *t* 检验,数据不满足正态分布时采用的是秩和检验。两变量间相关性分析在符合正态分布的线性关系时采用 Pearson 相关分析,否则使用 Spearman 相关分析。2 组间指标的表达水平采用 Mann - Whitney *U* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本资料及各项指标的检测结果 本研究共纳入 253 例慢性乙型肝炎患者, HBeAg 阳性患者 103 例,其中男性 62 例,女性 41 例,平均年龄为 (36.2 ± 11.89) 岁; HBeAg 阴性患者 150 例,其中男性 100 例,女性 50 例,平均年龄为 (49.96 ± 11.31) 岁。根据有无抗病毒治疗,可分为慢性乙型肝炎未治组 124 例,慢性乙型肝炎经治组 129 例。不同 HBeAg 状态下患者的性别、年龄、HBV RNA 水平、HBV DNA 水平、HBsAg 水平、ALT 水平、AST 水平及其检出率等基本信息详见表 1。

2.2 血清 HBV RNA、HBV DNA、HBsAg 的检出率, ALT、AST 异常率及表达水平 在 HBeAg 阳性组与 HBeAg 阴性组之间 HBV RNA 的表达水平差异有统计学意义 ($P < 0.001$), HBV DNA、HBsAg 表达水平差

异有统计学意义($P < 0.001$)。在 HBeAg 阳性组中, HBV RNA 阳性率为 97.09%, HBV DNA 阳性率为 67.96%, HBsAg 阳性率为 100.00%, ALT 异常率为 57.69%, AST 异常率为 50.49%。在 HBeAg 阴性组中, HBV RNA 阳性率为 68.67%, HBV DNA 阳性率为 30.67%, HBsAg 阳性率为 92.00%, ALT 异常率为 14.00%, AST 异常率为 21.30%。

2.3 血清 HBV RNA 与 HBV DNA、HBsAg 的相关性

分析 HBeAg 阳性组中,血清 HBV RNA 与 HBV DNA、HBsAg 成正相关(r 值分别为 0.855、0.669, $P < 0.001$); HBeAg 阴性组中,血清 HBV RNA 与 HBV DNA、HBsAg 成正相关(r 值分别为 0.476、0.375, $P < 0.001$)。在 CHB 未治患者中 HBV RNA 与 HBsAg、HBV DNA 成正相关(r 值分别为 0.779、0.918, $P < 0.001$)。CHB 经治患者中, HBV RNA 与 HBsAg 成正相关($r = 0.306$, $P < 0.001$)。

表 1 HBeAg 阳性组与 HBeAg 阴性组临床资料的比较

分组	性别(男/女例)	年龄(岁)	HBV RNA(IgIU/ml)	HBV RNA 阳性率(%)	AST(U/L)	AST 异常率(%)
HBeAg 阳性组	62/41	36.20 ± 11.89	5.96(4.13-7.30)	97.09	40(25-96)	50.49
HBeAg 阴性组	100/50	49.96 ± 11.31	1.93(0-2.73)	68.67	26(21-36)	21.30
<i>P</i> 值	0.292	<0.001	<0.001		0.003	

续表

分组	HBV DNA(IgIU/ml)	HBV DNA 阳性率(%)	HBsAg(IgIU/ml)	HBsAg 阳性率(%)	ALT(U/L)	ALT 异常率(%)
HBeAg 阳性组	7.06(0-7.84)	67.96	3.86(3.24-4.51)	100.00	48(25-193)	57.69
HBeAg 阴性组	0(0-2.94)	30.67	2.66(1.80-3.09)	92.00	24(17-36.25)	14.00
<i>P</i> 值	<0.001		<0.001		<0.001	

3 讨论

乙型肝炎病毒感染是导致慢性肝纤维化^[7]、肝硬化^[8]甚至肝癌^[9]的主要病因之一,因此慢性乙型肝炎病毒感染后的病情评估以及如何阻止疾病进一步进展十分关键。抗 HBV 治疗有效的标准是血清学的转换,其中 HBeAg 由阳转阴对于远期预后有着十分重要的意义^[10]。经过 NAs 类药物抗病毒治疗的 CHB 患者,绝大多数可以比较快地实现血清 HBV DNA 低于检测下限的目标,但只有极少数的患者可以在 1 年~2 年内就实现 HBeAg 的血清学转换。因此,血清 HBV DNA 阴性很难用来预测 HBeAg 血清学转换的可能性。

本研究通过比较 HBeAg 阳性组与 HBeAg 阴性组发现, HBeAg 阳性组的 HBV RNA 阳性率、HBV RNA 表达水平、HBV DNA 水平、HBsAg 水平、ALT 水平、AST 水平均高于 HBeAg 阴性组,说明 HBeAg 阳性患者体内的病毒水平及肝功能异常率更高。由于 HBV RNA 只能来自于肝内 cccDNA,所以提示 HBeAg 阳性的 CHB 患者肝内 cccDNA 转录活性更高。van Campenhout 等^[11]在未接受治疗的 CHB 患者中也得到了类似的结果, HBeAg 阳性的 CHB 患者血清 HBV RNA 水平高于 HBeAg 阴性的 CHB 患者,说明在 HBV 感染的人群中,不管有无接受抗病毒治疗, HBeAg 阳性都代表着患者体内有更高的病毒复制。有研究显示,在发生了 HBeAg 血清学转换的 CHB 患者中,血清 HBV RNA 一般会出现明显下降,相比较于其他指标,

HBeAg 血清学转换的最有价值的因素是血清 HBV RNA 的水平^[12]。另有研究发现,对于 HBeAg 阳性的患者,抗病毒治疗后 48 周的 HBV RNA 阴性与快速发生 HBeAg 血清学转换有关^[13]。因此推测,当在血清 HBV DNA 检测不到时,血清 HBV RNA 的变化水平在一定程度上是可以预测 HBeAg 的血清学转换的可能性。近期国内的一项多中心研究^[14]纳入了 130 例接受 NAs 类药物抗病毒治疗的 CHB 患者,来进行回顾性分析,对发生了 HBeAg 血清学转换且 HBV DNA 持续阴转至少 48 周的 CHB 患者停止治疗,发现停药时血清 HBV RNA 阴性组要较阳性组临床复发风险明显降低(15.3% vs 37.0%),血清 HBV DNA、HBV RNA 双阴性者临床复发的比例要显著低于血清 HBV DNA、HBV RNA 阳性组(8.0% vs 31.4%),故研究表明停药时血清 HBV DNA 和 HBV RNA 水平是临床复发的强独立预测因子,因此有学者提议将 HBV 总核酸(HBV RNA 和 HBV DNA)水平作为指导 CHB 患者停药可靠的生物学标记物。在临床上,观察到很少有患者能实现 HBsAg 清除, Jeng 等^[15]研究发现 HBeAg 阴性的 CHB 患者每年发生 HBsAg 阴转的比例只有 0.15%,因此对血清 HBsAg 低水平的患者,可在 HBV RNA 和 HBV DNA 均阴性的基础上考虑停药随访。

本研究结果说明血清 HBV RNA 与 HBsAg、HBV DNA 具有显著相关性,这种相关性在 HBeAg 阳性患者中要优于 HBeAg 阴性患者,慢性乙型肝炎未治患者中要优于慢性乙型肝炎经治患者。因本研究中所有经治的 CHB 患者 HBV DNA 均低于检测下限,所以

未进行相关性分析,然而有学者发现治疗后 HBV RNA 和 HBV DNA 仍相关,但相关性较治疗前减弱,因为 NAs 类药物使 pgRNA 的逆转录受到抑制,治疗过程中的 HBV DNA 不能准确反映 cccDNA 的活性;以上结果与 Mak 等^[16]的研究结论相符合,随着治疗时间的延长,HBV RNA 与 HBsAg、HBV DNA 的相关性逐渐下降。

综上所述,CHB 患者血清 HBV RNA 水平的检测可以代替 cccDNA 水平的检测,可以根据 HBV RNA 水平选择合适的时间停止抗病毒治疗。尤其是当血清 HBV DNA 水平低于检测的下限时,检测血清 HBV RNA 水平可以评估抗病毒治疗的疗效,来确定是否符合功能性治愈的标准,为临床的合理用药提供依据。因此,监测血清 HBV RNA 水平可能有助于管理慢性乙型肝炎人群,实现治疗方案因个体而异。

因本研究是一个横断面的研究,存在很多不足之处,且样本量也不足。后续可以扩大样本量,同时还可以继续对未治的 HBeAg 阳性 CHB 患者进行前瞻性队列研究,观察 HBeAg 阳性 CHB 患者在 NAs 治疗过程中血清 HBV RNA 水平的动态变化,评估基线及治疗过程中血清 HBV RNA、HBV DNA、HBsAg 对 HBeAg 血清学转换的预测能力及 HBV RNA 水平对患者预后的影响。

参考文献

- [1] 牛兴杰,刘志慧,崔凤梅,等. 相关炎症指标预测慢性乙型肝炎患者肝纤维化程度的价值[J]. 中华医院感染学杂志,2020,30(5): 703-708.
- [2] Guo JT, Guo H. Metabolism and function of hepatitis B virus cccDNA: Implications for the development of cccDNA-targeting antiviral therapeutics[J]. Antiviral Res, 2015, 122: 91-100.
- [3] 鲁凤民,王杰,陈香梅,等. 乙型肝炎病毒 RNA 病毒样颗粒的发现及其对抗病毒治疗临床实践的潜在影响[J]. 中华肝脏病杂志,2017,25(2): 105-110.
- [4] Liang LB, Zhu X, Yan LB, et al. Quantitative intrahepatic HBV cccDNA correlates with histological liver inflammation in chronic hepatitis B virus infection[J]. Int J Infect Dis, 2016, 52: 77-82.

- [5] Li JJ, Yu L, Dong D, et al. Evolution of an X-linked primate-specific micro RNA cluster[J]. Mol Biol Evol, 2010, 27(3): 671-683.
- [6] 中华医学会感染病学分会,中华医学会肝病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2019年版)[J]. 临床肝胆病杂志,2019,35(12): 2648-2669.
- [7] Lee HM, Banini BA. Updates on chronic HBV: Current challenges and future goals[J]. Curr Treat Options Gastroenterol, 2019, 17(2): 271-291.
- [8] Wu T, Li J, Shao L, et al. Development of diagnostic criteria and a prognostic score for hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure[J]. Gut, 2018, 67(12): 2181-2191.
- [9] Stourmaras E, Neokosmidis G, Stogiannou D, et al. Effects of antiviral treatment on the risk of hepatocellular cancer in patients with chronic viral hepatitis[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2018, 30(11): 1277-1282.
- [10] 王林,刘学恩,庄辉. 乙型肝炎病毒核心相关抗原定量检测的临床意义[J]. 中国病毒病杂志,2019,9(1): 24-32.
- [11] van Campenhout MJH, van Bömmel F, Pfefferkorn M, et al. Host and viral factors associated with serum hepatitis B virus RNA levels among patients in need for treatment[J]. Hepatology, 2018, 68(3): 839-847.
- [12] Huang YW, Takahashi S, Tsuge M, et al. On-treatment low serum HBV RNA level predicts initial virological response in chronic hepatitis B patients receiving nucleoside analogue therapy[J]. Antivir Ther, 2014, 20(4): 369-375.
- [13] Luo H, Zhang XX, Cao LH, et al. Serum hepatitis B virus RNA is a predictor of HBeAg seroconversion and virological response with entecavir treatment in chronic hepatitis B patients[J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(6): 719-728.
- [14] Fan R, Zhou B, Xu M, et al. Association between negative results from tests for HBV DNA and RNA and durability of response after discontinuation of nucleoside analogue therapy[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2019, 18(3): 719-727.
- [15] Jeng WJ, Chen YC, Chien RN, et al. Incidence and predictors of hepatitis B surface antigen seroclearance after cessation of nucleoside analogue therapy in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B[J]. Hepatology, 2018, 68(2): 425-434.
- [16] Mak LY, Cloherty G, Wong DKH, et al. HBV RNA profiles in chronic hepatitis B patients under different disease phases and anti-viral therapy[J]. Hepatology, 2021, 73(6): 2167-2179.

收稿日期:2022-06-27