

分类号: _____ 密级: _____
UDC: _____ 编号: _____

安徽医科大学 学位论文

HBV RNA 定量在 NAs 经治慢性乙型肝炎患者中的变
化特点及临床意义

Changes and clinical significance of HBV RNA quantification in
chronic hepatitis B patients treated with NAs

黄思然

指导教师姓名 郜玉峰 教授 安徽医科大学第一附属医院感染病科

申请学位级别 硕士 专业名称 内科学（传染病）

提交论文日期 2023.03.03 论文答辩日期 2023.05.11

学位授予单位和日期 安徽医科大学 2023.06

答辩委员会主席 徐静

评 阅 人 盲审

安徽医科大学
ANHUI MEDICAL UNIVERSITY

硕士学位论文

HBV RNA 定量在 NAs 经治慢性乙型肝炎患者中的变
化特点及临床意义

Changes and clinical significance of HBV RNA quantification in
chronic hepatitis B patients treated with NAs

作者姓名	黄思然
指导教师	郜玉峰 教授
学科专业	内科学（传染病）
研究方向	病毒性肝炎的基础与临床
论文工作时间	2020 年 8 月-2023 年 3 月

目 录

1 引言.....	6
2 材料和方法.....	11
2.1 研究对象.....	11
2.2 研究方法与材料.....	13
2.3 统计学方法.....	13
3.结果.....	14
3.1 患者的基本资料.....	14
3.2 不同 HBeAg 状态下不同治疗时间的血清 HBV RNA 阳性率 及定量值	15
3.3 影响 HBeAg 阴性组患者 HBV RNA 检出阳性的因素	17
3.4 血清 HBV RNA 与其他血清学标志物的相关性.....	19
3.5 不同 HBeAg 状态下未接受治疗的慢性 HBV 感染者与接受长 期 NAs 治疗的 CHB 患者的血清 HBV RNA 水平.....	20
4 讨论.....	20
5.结论.....	29
参考文献.....	29
综述 血清 HBV RNA 检测在慢性乙型肝炎抗病毒治疗中的应用价 值	35
参考文献.....	41

英文缩略词表(Abbreviation)

英文缩写	英文全称	中文全称
ALT	Alanine aminotransferase	谷丙转氨酶
AST	Aspartate aminotransferase	谷草转氨酶
CHB	Chronic hepatitis B	慢性乙型肝炎
cccDNA	Covalently closed circular DNA	共价闭合环状 DNA
EASL	European Association for the Study of the Liver	欧洲肝脏病研究协会
HBV	Hepatitis B virus	乙型肝炎病毒
HBV DNA	Hepatic B virus deoxyribose nucleic acid	乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸
HBV RNA	Hepatic B virus ribonucleic acid	乙型肝炎病毒核糖核酸
HBcrAg	Hepatitis B core-related antigen	乙肝病毒核心相关抗原
IFN	Interferon	干扰素类
Peg-IFN- α	Pegylated interferon-alpha	聚乙二醇干扰素- α
NAs	Nucleos(t)ide analogue	核苷酸类似物类
LAM	Lamivudine	拉米夫定
LDT	Telbivudine	替比夫定
ETV	Entecavir	恩替卡韦
ADV	Adefovir dipivoxil	阿德福韦酯
TDF	Tenofovir	替诺福韦
pgRNA	Pregenomic RNA	前基因组 RNA
rcDNA	relaxed-circular DNA	松弛环状 DNA

HBV RNA 定量在 NAs 经治慢性乙型肝炎患者中的变化特点及临床意义

中文摘要

目的

血清 HBV RNA 来源于肝内 cccDNA 的转录产物释放入血，与肝内 cccDNA 的相关性密切，在反映慢性乙型肝炎病情、指导临床治疗、判断停药预后等方面更加灵敏。我们收集接受有效核苷酸类似物（NAs）抗病毒治疗不同时间的慢性乙型肝炎（CHB）患者的血清并检测 HBV RNA，展现不同治疗时间下血清 HBV RNA 的水平变化及与其他病毒学标志物的相关性，分析影响血清 HBV RNA 水平的因素。

方法

纳入慢性乙型肝炎患者共 395 名。所有入组患者均接受规律 NAs 药物治疗 12 个月以上，至少 2 次间隔 3 个月连续检测血清 HBV DNA 满足低于检测下限。根据血清 HBeAg 状态，分为 HBeAg 阴性组(n=282)及 HBeAg 阳性组(n=113)，两组内根据接受 NAs 抗病毒治疗时间不同分别分为 1 年组、2 年组、3 年组、4 年组、5 年组及 5 年以上组；同期纳入未抗病毒治疗的慢性 HBV 感染者 93 例；采集血清标本进行 HBV RNA 检测，同时收集 HBsAg、HBeAg 等血清 HBV 标志物及肝功能检测结果。使用 SPSS25.0 软件进行数据分析，GraphPad Prism5.0 软件绘制统计图。计量资料以中位数（四分位数间距）[M（QR）]表示，两组之间比较采用曼惠特尼 U 检验，多组间两两比较采用 Kruskal-Wallis 检验；分类变量的比较采用 Pearson χ^2 检验，等级资料的比较采用 wilcoxon 秩和检验；单因素分析中 $P < 0.05$ 的变量纳入二元 logistic 回归分析， $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义；相关性分析

采用 Spearman 相关性分析方法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结果

HBeAg 阳性组中, 不同治疗时间的 HBV RNA 阳性率均为 100%, 接受 NAs 治疗 1 年组至 5 年以上组 HBV RNA 定量水平 (\log_{10} Copies/mL) 分别为 4.675(3.3225~6.23)、4.37(3.71~5.2475)、4.17(3.205~5.42)、4.045(3.4175~4.7625)、3.98(3.25~5.35)、3.865(3.155~5.88)。HBeAg 阴性组中, 1 年组至 5 年以上组 HBV RNA 阳性率分别为 72.0%、61.7%、61.29%、57.89%、43.64%、42.62%, HBV RNA 定量水平 (\log_{10} Copies/mL) 分别为 2.385(2.00~2.9775)、2.22(2.00~2.76)、2.38(2.00~2.93)、2.19(2.00~2.7025)、2.00(U~2.46)、2.00(UD~2.29)。在 HBeAg 阴性组中进行 HBV RNA 检出的影响因素分析, 二元 logistics 回归提示血清 HBsAg 水平及用药时长为 HBV RNA 检出的独立影响因素($OR=1.809, 0.867, P$ 均 < 0.05)。在 HBV RNA 与各血清学指标的相关性分析中, HBeAg 阳性组中 HBV RNA 与 HBeAg、HBsAg 呈正相关, 与 ALT、AST 及胆红素均无明显相关, HBeAg 阴性组中 HBV RNA 与各血清学指标均无明显相关。无论 HBeAg 状态, 未接受治疗的慢性 HBV 感染者血清 HBV RNA 水平均显著高于口服 NAs 药物治疗的 CHB 患者。

结论

在 NAs 经治的慢乙肝患者中, 持续病毒抑制时仍可在血清中检测到 HBV RNA, HBeAg 阳性患者有更高的 HBV RNA 阳性检出率及定量水平; HBeAg 阴性时, NAs 治疗时间和 HBsAg 水平是 HBV RNA 检出阳性的影响因素, 长治疗时间、低水平 HBsAg 会降低 HBV RNA 阳性率; HBeAg 阳性患者中 HBsAg 及 HBeAg 水平与 HBV RNA 水平相关。

关键词: HBV RNA, 慢性乙型肝炎, 核苷酸类似物, 乙型肝炎病毒

Changes and clinical significance of HBV RNA quantification in chronic hepatitis B patients treated with NAs

Abstract

Objective

Serum HBV RNA comes from the transcription of HBV cccDNA released into the blood and is more closely related to cccDNA, and it is more sensitive in reflecting the condition of chronic hepatitis B disease, guiding clinical treatment and determining the prognosis. We investigated changes in serum HBV RNA levels and detection rates in chronic hepatitis B (CHB) patients treated with active nucleotide analogues (NAs) over different years of antiviral therapy and their relationship with other virological markers.

Methods

395 patients with chronic hepatitis B were included. All enrolled patients received regular NAs therapy for more than 12 months, and serum HBV DNA was under the lower limit of detection at least 2 times with an interval of 3 months. According to the serum HBeAg status, the patients were divided into HBeAg negative group (n=282) and HBeAg positive group (n=113). The two groups were divided into 1 year group, 2 years group, 3 years group, 4 years group, 5 years group and > 5 years group according to the time of receiving NAs therapy. 93 patients with chronic HBV infection without antiviral treatment were enrolled. Serum samples were collected for HBV RNA detection, and serum HBV markers such as HBsAg, HBeAg and liver function detection results were collected.

Results

In the HBeAg-positive group, the detection rate of HBV RNA at different treatment time was 100%. The quantitative results of HBV RNA (log₁₀Copies/mL) in the 1-year group to the > 5-year group was 4.675(3.3225-6.23),4.37(3.71-5.2475), 4.17(3.205-5.42),4.045(3.4175-4.7625),3.98(3.25-5.35),3.865(3.155-5.88),respectively. In HBeAg negative group, the detection rates of HBV RNA from 1-year group to > 5-years group were 72.0%, 61.7%, 61.29%, 57.89%, 43.64% and 42.62%, respectively. The quantitative results of HBV RNA (log₁₀Copies/mL) were 2.385(2.00-2.9775), 2.22(2.00-2.76),2.38(2.00-2.93),2.19(2.00-2.7025),2.00(UD-2.46) and 2.00(UD-2.29), respectively. The influencing factors of HBV RNA detection were analyzed in the HBeAg negative group. Binary logistics regression showed that serum HBsAg levels and duration of medication were independent influencing factors of HBV RNA detection(OR=1.809,0.867,P<0.05).In the correlation analysis of HBV RNA and other serological indicators, HBV RNA in HBeAg positive group was positively correlated with HBeAg and HBsAg, but not significantly correlated with ALT, AST and bilirubin, and HBV RNA in HBeAg negative group was not significantly correlated with any serological indicators.Regardless of HBeAg status, serum HBV RNA levels in untreated chronic HBV infected patients were higher than CHB patients treated with oral NAs drugs.

Conclusion

After long-term NAs treatment, serum HBV RNA can be detected,while HBV DNA levels is below the lower limit of detection.Patients with HBeAg-positive have a higher positive detection rate and quantitative level of HBV RNA than which with HBeAg-negative. When HBeAg is negative, patients with detectable HBV RNA receive shorter treatment time and have higher HBsAg levels. HBsAg and HBeAg levels may be correlated with HBV RNA levels in HBeAg-positive patients.

Key words: HBV RNA;Chronic hepatitis B;Nucleos(t)ide analogue;Hepatitis B virus

HBV RNA 定量在 NAs 经治慢性乙型肝炎患者中的变化特点及临床意义

1 引言

乙型肝炎病毒（hepatitis B virus, HBV）属于嗜肝病毒科，是一种小包膜的 DNA 病毒。每个乙肝病毒粒子内含约 3.2kb 长度的部分环状双链 DNA 基因组^[1]。在 HBV 感染人体过程中，病毒通过结合肝细胞膜上称之为 NTCP（钠离子-牛磺酸共转运蛋白）的受体侵入宿主肝细胞，并在细胞质中去除核衣壳形成松弛环状 DNA(rcDNA)。rcDNA 进入肝细胞核，以负链 DNA 为模板，在 DNA 聚合酶和拓扑异构酶的作用下填补缺口，折叠扭转后形成共价闭合环状 DNA(cccDNA)^[2-3]。HBV cccDNA 可作为转录模板，转录四种不同长度的 mRNA。这一步骤是病毒进入肝细胞后复制的起始，并指导和维持着所有下游步骤的进展和病毒基因产物的表达；HBV cccDNA 具有稳定的超螺旋结构，半衰期长、不易降解，且难以被现有治疗方案根除，这是 HBV 感染易慢性化、难以治愈、停药后易复发的主要原因^[4]。

HBV 感染的症状包括乏力、低热和肝区疼痛等，持续感染人体可引起肝脏慢性炎症性疾病，即慢性乙型肝炎（chronic hepatitis B, CHB），是发生肝功能衰竭、肝硬化、肝癌的重要危险因素。慢性 HBV 感染已成为一个全球性的公共卫生问题。根据世界卫生组织（WHO）的统计数据，全世界约有 2.57 亿慢性 HBV 感染者，其中我国的感染者人数约占 1/3；在过去的几十年间，我国通过在普及乙肝疫苗、早期筛查病例、抗病毒治疗进展及全民健康教育等方面的努力，已在 HBV 防治方面取得了巨大进展^[5]，但由于人口众多，HBV 感染者人数也相对较多，据估计，我国约有 7000 万例慢性 HBV 感染者，其中有约 2000 万至 3000 万例为 CHB 患者^[6-7]。CHB 治疗的目标是减少肝细胞的炎症性坏死，抑制肝纤维组织的增生。目前，

CHB 患者在临床上的主要治疗方案包括抗 HBV、抗炎、抗纤维化、肝脏功能保护和免疫调节，其中抗病毒治疗为最重要的一项治疗措施^[7]。有大量研究为此提供证据。根据希腊的一项全国性队列研究^[8]的结果，及时有效的抗病毒治疗可显著降低 CHB 患者临床不良事件（即肝硬化失代偿、肝细胞肝癌、肝功能衰竭及肝脏相关因素导致的死亡）的发生率。在一项针对长期抗病毒治疗的 CHB 患者肝脏纤维化程度的研究^[9]中，基线时有 96 例肝纤维化 CHB 患者，经过 5 年的规范治疗并且持续保持病毒学抑制状态，其中 71 例患者出现了肝纤维化的逆转。同样，Jang 等在对 HBV 相关性肝硬化失代偿期患者的研究^[10]中获得了类似的结果，即病毒治疗可显著延缓此类患者肝脏病变的进展，延长生存时间，提高生存质量。启动抗病毒治疗需要综合血清 HBV DNA、ALT 水平、肝病严重程度，以及年龄、家族史和伴随疾病来全面评估。2019 年版《慢性乙型肝炎防治指南》^[7]中提出，满足以下任一条件建议进行抗病毒治疗：（1）非肝硬化患者：血清 HBV DNA 阳性，持续 ALT 异常(> ULN)，并且排除导致 ALT 升高的其他原因（如酒精性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、合并其他病原体感染、药物性或自身免疫性肝损伤等）；（2）存在肝硬化的客观依据者：血清中可检测到 HBV DNA；（3）失代偿期肝硬化患者：HBsAg 阳性，血清 HBV DNA 低于/不低于检测下限；（4）具有疾病进展的高危因素者：血清 HBV DNA 阳性，伴/不伴 ALT 异常。

现国内外指南推荐的抗 HBV 药物有两种：干扰素类（interferon），以及核苷酸类似物类（nucleos(t)ide analogue, NAs）^[7,11]。干扰素类包括干扰素- α （IFN- α ）和聚乙二醇干扰素- α （Peg-IFN- α ），抗病毒作用是通过细胞表面受体产生抗病毒蛋白以及调节机体对 HBV 的免疫反应来实现，治疗时间短，HBeAg 或 HBsAg 血清转换率高，具有疗效精确、耐药率低的优点。但需要皮下注射，实现方式较为复杂，且对用药人群有限制，长期应用骨髓抑制、诱发自身免疫性疾病等不良反应较多，临床应用受到限制^[12-14]。NAs 是临床应用最广泛的抗病毒药物。2016 年中国乙型肝炎登记处的数据显示，33533 例慢性乙型肝炎患者中，约 88.7% 接受了 NAs 治疗。NAs 为 HBV 聚合酶抑制剂，具有类似于天然核苷酸的结构，作用于乙

肝病毒复制周期中的逆转录过程，在 HBV 聚合酶催化位点上竞争性地取代子代聚合酶链延长所需的核苷酸，而其自身缺乏羟基，阻止与相邻核苷酸形成共价键，导致 DNA 链延伸终止，从而阻断病毒 DNA 的合成，达到抑制病毒复制过程的效果^[14]。目前批准上市的 NAs 类药物包括：拉米夫定（LAM）、替比夫定（LDT）、恩替卡韦（ETV）、阿德福韦酯（ADV）及替诺福韦（TDF），这些药物只需口服治疗，使用方便，具有患者依从性高、耐受性好以及副作用小等优点，并且是有失代偿性肝病、肝移植、肝外并发症、急性肝炎或重型肝炎的患者的唯一选择^[11]。

NAs 治疗的基石是阻断病毒逆转录合成 HBV DNA 的过程，旨在使病毒保持持续抑制状态，这对于疾病的发展及转归具有重要意义。对于处于 HBV 持续受抑状态的肝硬化患者，有一定比例会发生肝硬化逆转，同时肝细胞肝癌的发生率也得到降低^[9]。然而，尽管规范的 NAs 药物治疗可实现持续的病毒学抑制（即血清 HBV DNA 持续未能检出），但 NAs 对 HBV 感染细胞核内的 cccDNA 及整合于宿主细胞上的病毒基因组并无直接影响。如前所述，HBV cccDNA 在肝组织中持续稳定存在和功能保留是 HBV 感染慢性化的主要原因，则测量 cccDNA 水平是评估 HBV 在体内的复制和感染状态的最直接的方法。但在血清中 cccDNA 含量低，肝内检测 cccDNA 需要有创的肝脏穿刺，实现较为困难，并且目前尚无广为认可的统一量化标准^[6]。临床上使用易获得的血清病毒学标志物来作为 cccDNA 的替代，反映肝内病毒复制活性、指导临床用药。在血清中，乙肝病毒的复制产物主要以 3 种形式存在：（1）病毒颗粒：Dane 颗粒（含 HBsAg、HBcAg、HBV DNA）和 RNA 病毒样颗粒（含 HBsAg、HBcAg、HBV RNA）；（2）亚病毒颗粒：球形颗粒、管形颗粒和空病毒颗粒；（3）可溶性蛋白质：HBeAg、HBcAg、前核心蛋白 p22cr 等，总称为乙肝核心相关抗体（HBcrAg）。目前应用最为广泛的 cccDNA 替代标志物就是血清 HBV DNA 及 HBsAg。HBV DNA 水平联合肝脏炎症程度是国内外指南^[7,11]中推荐的 NAs 药物起始治疗指征的基础；而 NAs 治疗的最安全停药标准被称为功能性治愈，即血清中检测不到 HBV DNA 以及 HBsAg、伴或不伴 HBsAg 的血清转换，此时 HBV 的复制和病毒蛋白的表达已经受到了抑制；对于正

在接受 NAs 治疗的 CHB 患者，HBV DNA 及 HBsAg 也是指南推荐的用药监测、临床随访的血清学指标。但基于对 NAs 药理作用及 HBV 生命周期研究的深入，传统的血清学指标显露出一定的缺陷。对于血清 HBV DNA，虽然它在现有的用于反映体内病毒复制情况的血清学指标中应用最为广泛，但对于长期 NAs 治疗的患者可能并不适用。由于 NAs 抗病毒治疗阻断子代 DNA 合成中的逆转录过程，血清 HBV DNA 往往在开始治疗后迅速下降直至低于检测下限，然而这种情况只能说明逆转录过程受到有效抑制，无法说明 HBV cccDNA 的转录水平是否受到影响。所以在抗病毒治疗期间，即使血清 HBV DNA 降低至无法检出的水平，机体内仍可能持续存在残留的病毒血症，此时 HBV DNA 不再具备进一步评估病情的价值^[14]。HBsAg 同样不适用于长期 NAs 治疗的 CHB 病人。HBsAg 主要由 HBV cccDNA 转录后合成的长度为 2.4、2.1kb 的 mRNA 翻译而来，已有研究发现^[2,15]，接受长期 NAs 治疗的患者实现血清 HBsAg 清除的比例相对于发生自发性清除的比例没有明显升高；此外，在 NAs 治疗过程中，与 HBV DNA 在治疗后可迅速减低不同，血清 HBsAg 水平在长时间内几乎保持不变^[18-20]。原因可能是除了 cccDNA 之外，HBsAg 的相当一部分也来源于整合于宿主细胞上的 HBV DNA；有研究表明^[20]，在慢性 HBV 感染的患者中，大约有相当于总肝细胞的 1% 的受感染肝细胞携带 HBV DNA 整合片段，所整合片段的 HBV DNA 容易发生突变、缺失、插入和重排，丧失转录成病毒 mRNA 的能力，但是乙肝病毒 DNA 环的 S 区结构相对稳定，可以继续转译出 HBsAg，而肝细胞的更新周期缓慢，在慢性炎症过程中，整合的 HBV DNA 往往成为血清 HBsAg 的稳定来源，降低了 HBsAg 作为病毒复制标志物的特异性。以血清 HBsAg 得到清除作为停药标准意味着停药难以实现，绝大多数患者都需要长期乃至终身治疗。所以，对于长期抗病毒治疗的 CHB 患者，寻找受药物影响小、灵敏度高且与 cccDNA 关系确切的新型血清学指标成为国内外关注的热点，用以准确评估抗病毒疗效、指导临床治疗方案、定义合理安全的治疗终点。

尽管近年来，在血清内的 3 种 HBV 病毒学复制产物中，HBcrAg 及空病毒颗粒应用于抗病毒疗效检测的价值受到越来越多重视，但目前进一步应用临床都面

临一定困难。HBcrAg 主要存在于肝细胞核中，血清中仅有少量游离的微量 HBcrAg 存在，易被抗体中和，限制了临床的开展；空病毒颗粒检测方法复杂，在现有的检测方法及技术下难以实现。而包裹于 RNA 病毒样颗粒内的 HBV RNA，目前来源及性质已经多项研究阐明，定量方法也相对较为简便，实现难度较小，在 HBV 感染的新型血清学指标中最令人关注。早在 1996 年，已有学者在 CHB 患者的血清中检测出了 HBV RNA，并提出血清 HBV RNA 含量可能与肝内病毒复制活性有关^[21]。之后有多项研究证实，血清 HBV RNA 水平与 HBV 感染状态、病情进展及 HBeAg 血清学转换等方面关系密切，有临床监测疾病进程、评估用药效果的巨大潜力^[22-25]。随着对 HBV 生命周期的深入了解，血清 HBV RNA 的来源也得到了解答。在 HBV 的生命周期中，HBV cccDNA 在受感染的肝细胞核内可作为转录模板合成四种长度不同的 mRNA(分别为 3.5 kb、2.4kb、2.1kb、0.7kb)，其中长度为 3.5kb 的 mRNA 又有两种：前核心区 mRNA (PreC mRNA) 和前基因组 RNA(pregenomic RNA, pgRNA)。PreC mRNA 编码 HBeAg，而 pgRNA 则是子代 HBV DNA 合成中的逆转录过程的模板^[3]。Wang 等的团队在研究中发现^[26]，外周血中的 HBV RNA 实际上是由肝内的 pgRNA 在未经转录或部分转录的情况下经衣壳化、获得包膜后释放入血而来，并在血清中以核衣壳包被的内含 pgRNA 的病毒样颗粒形式存在并被测量；由于 NAs 对病毒复制周期的影响，在长期治疗过程中，血清中 HBV DNA 和 HBV RNA 的水平可出现分离，HBV DNA 的合成受到抑制的同时，pgRNA 的合成过程却被完整保留，使其得以在肝脏中积累并释放入血；一项涉及 111 例接受恩替卡韦治疗的 CHB 患者的研究^[29]发现，NAs 抗病毒治疗的过程中，血清中 HBV DNA 水平下降的速度快于 HBV RNA 的下降。Butler EK 等的研究^[27]也得到相似的结果，该研究通过随访 NAs 初治的 CHB 患者，并检测血清 HBV RNA 及血清 HBV DNA，结果发现接受 NAs 治疗后，血清中的 HBV RNA 浓度始终高于 HBV DNA 浓度。有研究^[28]发现，虽然血清 HBV RNA 水平与 cccDNA 含量之间的相关性并不稳定，但 HBV RNA 水平与 cccDNA 的转录活性相关。Marcellin 等的研究^[9]用肝内的 pgRNA 与 cccDNA 之间的比值来反映 cccDNA 的转录活性，从而分析血清 HBV RNA 浓度与 cccDNA 活性之间的相关性，结果证实 HBV RNA 可反映 cccDNA

转录的活性，并且这种相关性可以延续到接受治疗后获得 HBV DNA 持续抑制的患者中。Wang 等针对恩替卡韦治疗的 CHB 患者的研究^[29]结果显示，与传统的血清学指标相比，血清 HBV RNA 作为 HBV cccDNA 的直接转录产物，合成的唯一模板为 cccDNA，特异性好，受药物影响较小，可以更精确地反映肝内 cccDNA 的活性，为 CHB 患者提供更直接的病毒复制证据，预测 NAs 停药后的复发风险。血清 HBV RNA 在长期用药的 CHB 患者的临床诊治、用药监测及预后评估等方面均展现出良好的前景，随着日后检测技术的发展成熟，HBV RNA 有望被更进一步推广应用于临床抗病毒治疗领域，尤其对于长期 NAs 治疗的血清 HBV DNA 受抑制患者，可能会成为评估残留病毒活性、预测病毒学复发可能性的最佳工具。

本研究中，我们通过检测 HBV DNA 持续受抑制的 CHB 患者在不同 NAs 治疗时间下的血清 HBV RNA 水平，并比较其与其他传统的血清学标志物的关系，探讨影响此类患者血清 HBV RNA 水平及阳性检出率的相关因素，进一步探究血清 HBV RNA 测定在 NAs 治疗中的临床意义。

2 材料和方法

2.1 研究对象

本研究为横断面研究。通过安徽医科大学第一附属医院门诊病例系统，纳入 2020 年 9 月至 2022 年 3 月期间就诊于本院感染病科门诊的接受规律 NAs 抗病毒治疗的慢性乙型肝炎患者 395 例，同期纳入未抗病毒治疗的慢性 HBV 感染者 93 例。纳入的抗病毒治疗 CHB 患者中，根据血清 HBeAg 状态，分为 HBeAg 阳性组 113 例，HBeAg 阴性组 282 例。同一 HBeAg 状态的两组内基于接受核苷酸类似物（NAs）抗病毒治疗时间长度分为 1 年组、2 年组、3 年组、4 年组、5 年组及 5 年以上组。所有 CHB 病例的诊断均符合中华医师学会制定的《慢性乙型肝炎防治指南（2019 年版）》中的诊断标准，并接受长达一年及以上的 NAs 规范治疗，HBV DNA 已低于检测下限（免疫荧光 qPCR 法定量 $<300\text{IU/mL}$ 或罗氏 Cobas 检验 $<20\text{IU/mL}$ ）。所有的慢性 HBV 感染病例均满足检测血清 HBsAg 阳性持续时间至少

6个月。排除标准：（1）正在或既往接受干扰素或免疫制剂治疗；（2）合并 HAV、HCV、HEV 等其他类型肝炎病毒感染；（3）合并酒精肝、非酒精性脂肪肝、药物性肝炎、自身免疫性肝炎等其他类型肝炎；（4）妊娠或哺乳期妇女；（5）合并严重全身性疾病或有肝细胞癌证据。

根据血清 HBeAg 抗原状态的不同，将所有 NAs 治疗的 CHB 患者分为 HBeAg 阳性组和 HBeAg 阴性组，比较两组之间的基线特征，包括年龄、性别、抗病毒治疗时间、HBsAg、HBeAg、ALT、AST、总胆红素、有无合并（乙型肝炎）肝纤维化或肝硬化。其中合并肝硬化/肝纤维化的诊断标准为：经组织学、超声或肝脏瞬时弹力检测提供肝硬化/肝纤维化的证据，病史或检查提供证据明确或排除其他常见病因：酒精、药物、自身免疫、其他嗜肝病毒感染等。

测量 NAs 治疗中的 CHB 患者的血清 HBV RNA，高于可定量下限（ $>2\log_{10}\text{Copies/mL}$ ）定义为阳性，余定义为阴性，低于定量下限但仍可检出的值定量为 $2\log_{10}\text{Copies/mL}$ ，低于检出下限（UD）的值定量为 0，统一进行统计分析。比较 HBeAg 不同状态的两组之间及同一 HBeAg 状态的组内不同治疗时间之间在血清 HBV RNA 阳性率及定量水平方面的差异。

将血清 HBV RNA 状态（阳性/阴性）作为分组变量，纳入接受治疗时长，年龄，HBsAg，胆红素，ALT，AST 及合并肝纤维化/肝硬化与否进行单因素分析，选取单因素分析中 $P<0.05$ 的变量纳入二元 logistic 回归分析。研究与血清 HBV RNA 检测阳性相关的因素。同时，以 HBsAg 定量水平划分为低（ $<500\text{IU/mL}$ ）、中（ $500\sim1500\text{IU/mL}$ ）、高（ $>1500\text{IU/mL}$ ）三组，比较 HBV RNA 阳性与阴性组患者在 HBsAg 水平上的分布。

分析 HBeAg 不同状态的两组内，HBV RNA 阳性（可定量）的患者 HBV RNA 水平与其他的病毒学指标（HBsAg、HBeAg）及肝功能指标（AST、ALT、胆红素）之间的相关性。

同步检测未接受治疗的慢性 HBV 感染者的血清 HBV RNA，将纳入的慢性感染者根据 HBeAg 的不同状态也分为 HBeAg 阳性组及 HBeAg 阴性组，比较同一

HBeAg 状态下的未接受治疗的慢性 HBV 感染者与接受 NAs 治疗的 CHB 患者之间 HBV RNA 水平。

2.2 研究方法与材料

所有采集的血清样本储存在 -80°C 冰箱中。采用罗氏 550 全自动生化分析仪检测血清生化指标，采用罗氏 cobas 6000 全自动免疫分析仪检测乙肝病毒血清学标志物（HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc）（HBsAg > 0.05 IU/ml 为阳性，HBeAg ≥ 1.0 COI 为阳性）。

血清 HBV RNA 的测定采用 AutoSAT 全自动核酸检测分析系统，试剂盒采用 RNA SAT 检测试剂盒，由上海仁度生物技术有限公司提供。该试剂盒基于 RNA 捕获探针法，包括核酸提取和扩增两部分试剂，检测方法使用实时荧光恒温扩增法（SAT）。核酸提取采用有特异捕获序列的 RNA 探针修饰的磁珠，通过靶标捕获和洗涤两步骤，对提取到的 HBV RNA 进行扩增，并在扩增过程中实时检测荧光信号。在全自动核酸检测分析系统（AutoSAT）上进行检测，仪器配套软件根据检测结果自动计算样本中的 HBV RNA。定量下限(LLOQ)为 100 Copies/mL(即 $2 \log_{10}\text{Copies/mL}$)，低于定量下限定义为阴性。低于定量下限但仍可检测到的值以 $2 \log_{10}\text{Copies/mL}$ 统一进行统计分析，无法检测到（UD）的值定量为 0（ $\log_{10}\text{Copies/mL}$ ）。

2.3 统计学方法

使用 SPSS 软件（版本：25.0）软件进行数据分析，GraphPad Prism 软件（版本：5.0）绘制统计图。HBV RNA、HBsAg、HBeAg 定量取对数值进行统计计算；计量资料均呈非正态分布，以中位数（四分位数间距）[M（QR）]表示，两组之间比较采用曼惠特尼 U 检验，多组间两两比较采用 Kruskal-Wallis 检验；分类变量的比较采用 Pearson χ^2 检验，等级资料的比较采用 wilcoxon 秩和检验；单因素分析中 $P < 0.05$ 的变量纳入二元 logistic 回归分析， $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义；相关性分析采用 Spearman 相关性分析方法， $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3. 结果

3.1 患者的基本资料

纳入符合标准的 CHB 患者共 395 例，其中男性 283 例，女性 112 例，平均年龄 43.0(33.0~52.0)岁，根据血清 HBeAg 状态分为 HBeAg 阳性组(n=113)及 HBeAg 阴性组 (n=282) 两组，血清 HBV RNA、HBsAg、HBeAg、肝功能 (ALT、AST、胆红素) 以及合并肝硬化等情况详细见表 1。两组在 ALT、AST 及胆红素水平上无明显差异，HBeAg 阴性组表现出更高的平均年龄 (eAg 阴性组:47.0 vs eAg 阳性组:34.0, $P<0.0001$) 及合并肝纤维化及肝硬化的比例 (eAg 阴性组:36.52% vs eAg 阳性组:14.16%, $P<0.0001$)。

检测所有纳入患者的血清乙肝病毒标志物 (HBsAg、HBeAg、HBV RNA)。结果显示,HBeAg 阳性组中,全部 113 例患者均可检出 HBV RNA,且阳性率 100%; HBeAg 阴性组 282 例患者中, HBV RNA 阳性的有 156 例, 占比 55.32%。在 HBV RNA 定量水平上, HBeAg 阳性组显著高于 HBeAg 阴性组, 差异具有统计学意义 (eAg 阳性组:4.17 vs eAg 阴性组:2.13, $P<0.0001$)。同时, HBeAg 阳性组具有更高的 HBsAg 水平 (eAg 阳性组:3.26 vs eAg 阴性组:2.61, $P<0.0001$)。

表 1 患者的基线资料

Tab 1 Baseline characteristics of patients

	HBeAg 阳性组 (n=113)	HBeAg 阴性组 (n=282)	P 值
性别 (男/女)	72/41	211/71	0.027
年龄 (岁)	34(28~43)	47(36~54)	< 0.0001
HBV RNA (log ₁₀ Copies/mL)	4.17(3.38~5.35)	2.13(2.00~2.66)	< 0.0001
HBV RNA 阳性(n%)	113(100%)	156(55.32%)	< 0.0001
HBsAg (log ₁₀ IU/mL)	3.26(2.94~3.54)	2.61(2.17~3.07)	< 0.0001

HBeAg (log ₁₀ COI)	0.97(0.42~1.71)	—	—
丙氨酸氨基转移酶 (U/L)	25(17~35)	23(17~32)	0.176
天门冬氨酸氨基转移酶 (U/L)	22.0(17.5~26.0)	22.0(19.0~25.3)	0.452
总胆红素 (umol/L)	14.90(11.25~18.55)	14.90(11.68~18.80)	0.282
是否合并肝纤维化/肝硬化 (是)	16(14.16%)	103(36.52%)	< 0.0001

3.2 不同 HBeAg 状态下不同治疗时间的血清 HBV RNA 阳性率及定量值

在纳入的 HBeAg 阳性患者中, 所有患者血清 HBV RNA 均为阳性, 阳性率不随用药时间延长而变化 (表 2)。在 HBeAg 阴性组中, 随着 NAs 治疗时间延长, 从 1 年到 5 年以上组的阳性率呈逐年下降, 分别为 72.0%、61.7%、61.29%、57.89%、43.64%、42.62% (表 2、图 1), 6 组之间阳性率差异具有统计学意义 ($P=0.016$)。

不同治疗时间的血清 HBV RNA 水平变化展示在表 2 及图 2。HBeAg 阳性组血清 HBV RNA 定量 (log₁₀Copies/mL) 从 1 年到 5 年以上组分别为: 4.675(3.3225~6.23)、4.37(3.71~5.2475)、4.17(3.205~5.42)、4.045(3.4175~4.7625)、3.98(3.25~5.35)、3.865(3.155~5.88); HBeAg 阴性组血清 HBV RNA 定量 (log₁₀Copies/mL) 从 1 年到 5 年以上组分别为: 2.385(2.00~2.9775)、2.22(2.00~2.76)、2.38(2.00~2.93)、2.19(2.00~2.7025)、2.00 (UD~2.46)、2.00(UD~2.29); 在每一个抗病毒治疗时间点上, HBeAg 阳性组的 HBV RNA 定量水平均高于 HBeAg 阴性组的水平。HBeAg 阳性组内, 血清 HBV RNA 值维持在稳定高值, 在不同用药时间组之间差异无统计学意义 ($P=0.820$)。在 HBeAg 阴性组内, 血清 HBV RNA 在不同用药时间上定量值不同, 接受抗病毒治疗 1 年组 HBV RNA 水平最高, 5 年组及 5 年以上组最低, 总体差异具有统计学意义 ($P=0.0003$); 将不同抗病毒治疗时间的小组进行两两比较, 结果显示 1 年组与 5 年组、1 年组与 5 年以上组之间的 RNA 定量水平差异具有统计学意义 (P 均 <0.05), 其余各组之间的

RNA 定量水平未见有统计学意义的差异 ($P>0.05$) (图 2)。

表 2 不同治疗时长的 HBV RNA 水平及阳性率

Tab 2 HBV RNA levels and positive rates for different treatment duration

用药时间(年)	HBV RNA 阳性(n%)	HBV RNA (log ₁₀ Copies/mL)	
HBeAg(+) (n=113)	1	24/24(100%)	4.68(3.32~6.23)
	2	24/24(100%)	4.37(3.71~5.25)
	3	17/17(100%)	4.17(3.21~5.42)
	4	18/18(100%)	4.05(3.42~4.76)
	5	14/14(100%)	3.98(3.25~5.35)
	>5	16/16(100%)	3.87(3.16~5.88)
	p 值	—	0.820
HBeAg(-) (n=282)	1	36/50(72.00%)	2.39(2.00~2.98)
	2	29/47(61.70%)	2.22(2.00~2.76)
	3	19/31(61.29%)	2.38(2.00~2.93)
	4	22/38(57.89%)	2.19(2.00~2.70)
	5	24/55(43.64%)	2.00 (UD*~2.46)
	>5	26/61(42.62%)	2.00(UD~2.29)
	p 值	0.016	0.000

* UD: 低于检测下限

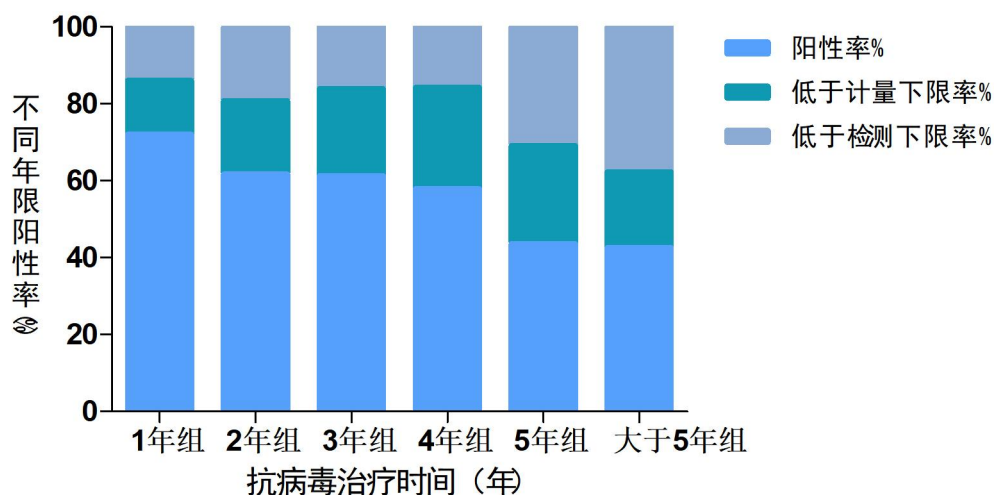
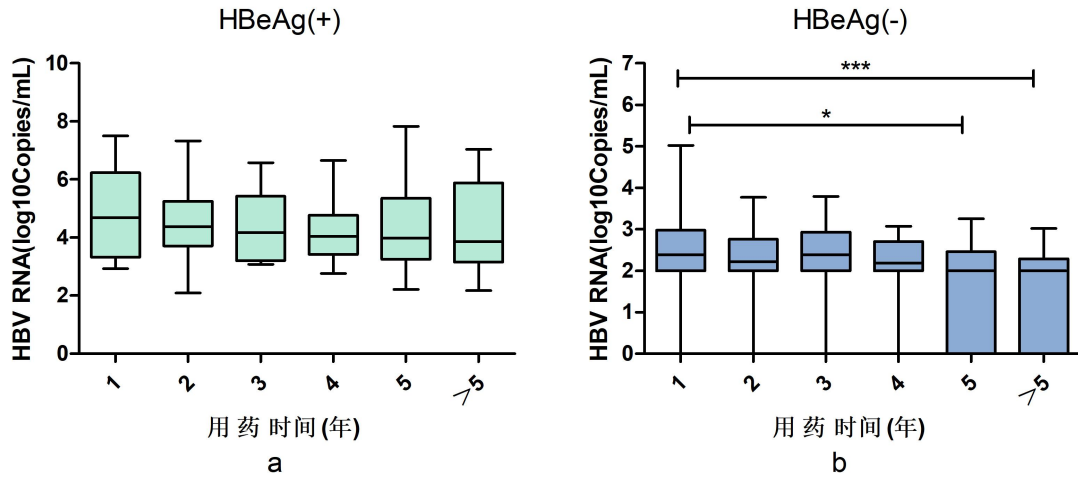


图 1 HBeAg 阴性组的 HBV RNA 阳性率

Fig 1 HBV RNA positive rate in HBeAg negative group



注：***：显著差异 *：有差异

图 2 不同治疗时长的血清 HBV RNA 水平

Fig 2 Serum HBV RNA levels for different treatment duration

3.3 影响 HBeAg 阴性组患者 HBV RNA 检出阳性的因素

HBeAg 阴性组共 282 例患者中，有 126 例血清 HBV RNA 检测阴性，156 例血清 HBV RNA 检测阳性；以血清 HBV RNA 不同检测状态分组，研究年龄、接受治疗时长、HBsAg、胆红素、ALT、AST 及合并肝纤维化/肝硬化与否等因素对 HBV RNA 阳性率的影响，结果展示在表 3。结果可见，年龄、ALT、AST、是否合并肝硬化/肝纤维化不影响 HBV RNA 的阳性检出率，HBV RNA 阳性组中位治疗时间为 3 年，阴性组中位治疗时间为 5 年，两组间差异具有统计学意义 ($P=0.0003$)；HBV RNA 阳性组的 HBsAg 水平及胆红素水平高于 HBV RNA 阴性组，差异有统计学意义 (P 均 <0.05)。

同时，将患者以 HBsAg 定量水平划分为 HBsAg 低水平 ($\text{HBsAg} < 500\text{IU/ml}$)、中水平 ($\text{HBsAg} 500\text{IU/ml} \sim 1500\text{IU/ml}$)、高水平 ($\text{HBsAg} > 1500\text{IU/ml}$) 三组，低、中、高 HBsAg 水平组 HBV RNA 阳性率依次为 32.7%、60.1%、63.0%，用 Wilcoxon 秩和检验比较 HBV RNA 阳性组与阴性组患者在 HBsAg 水平分布上的差异，结果提示有统计学意义 ($P=0.001$)。

进一步使用二元 Logistic 回归分析探究治疗时长、HBsAg 定量及胆红素对于

HBV RNA 阳性率的影响。结果如表 4 示, HBsAg 水平及接受治疗时长为 HBV RNA 阳性的影响因素 (OR=1.809、0.867, P 均<0.05), 高 HBsAg 水平、短治疗时间意味着更高的 HBV RNA 阳性率; 胆红素水平不是 HBV RNA 阳性检出的独立影响因素。

表 3 各指标对 HBeAg 阴性患者 HBV RNA 阳性率影响

Tab 3 Effects of each index on HBV RNA positive rate in HBeAg negative patients

	HBV RNA 未检出 (n=126)	HBV RNA 检出 (n=156)	统计值	P 值
治疗时长 (年)	5(2~6)	3(2~5)	Z=-3.597	0.000
年龄 (岁)	46.5(35.0~54.0)	47.0(38.0~53.8)	Z=-0.666	0.506
HBsAg (log ₁₀ IU/ mL)	2.42(1.89~2.94)	2.77(2.32~3.10)	Z=-3.828	0.000
低	37	18		
中	69	104	Z=-3.187	0.001
高	20	34		
胆红素 (umol/L)	14.35(11.28~17.70)	15.90(12.13~20.15)	Z=-2.421	0.015
ALT (U/L)	22.0(16.8~30.0)	23.0(17.0~32.8)	Z=-1.342	0.180
AST (U/L)	22(18~25)	23(19~26)	Z=-1.426	0.154
肝硬化 /肝纤 维化	87 39	92 64	χ ² =3.051	0.081

表 4 影响 HBV RNA 是否阳性的多因素分析

Tab 4 Multifactorial analysis of HBV RNA positivity

	显著性	OR	95%CI
HBsAg	0.001	1.809	1.294~2.531
胆红素	0.398	1.011	0.986~1.037
治疗时长	0.004	0.867	0.786~0.955

3.4 血清 HBV RNA 与其他血清学标志物的相关性

对血清 HBV RNA 与其他血清学标志物进行相关性分析，结果见图 3。HBeAg 阳性组内，血清 HBV RNA 水平与 HBeAg 呈显著正相关（图 3a， $r=0.6954$ ； $P<0.0001$ ），与 HBsAg 呈正相关（ $r=0.3925$ ； $P<0.0001$ ），与 ALT、AST 及胆红素无明显相关；HBeAg 阴性组内，仅选取 HBV RNA 可定量的患者纳入相关性分析，结果提示 HBV RNA 与 HBsAg、ALT、AST、胆红素均无明显相关性（图 3b）。

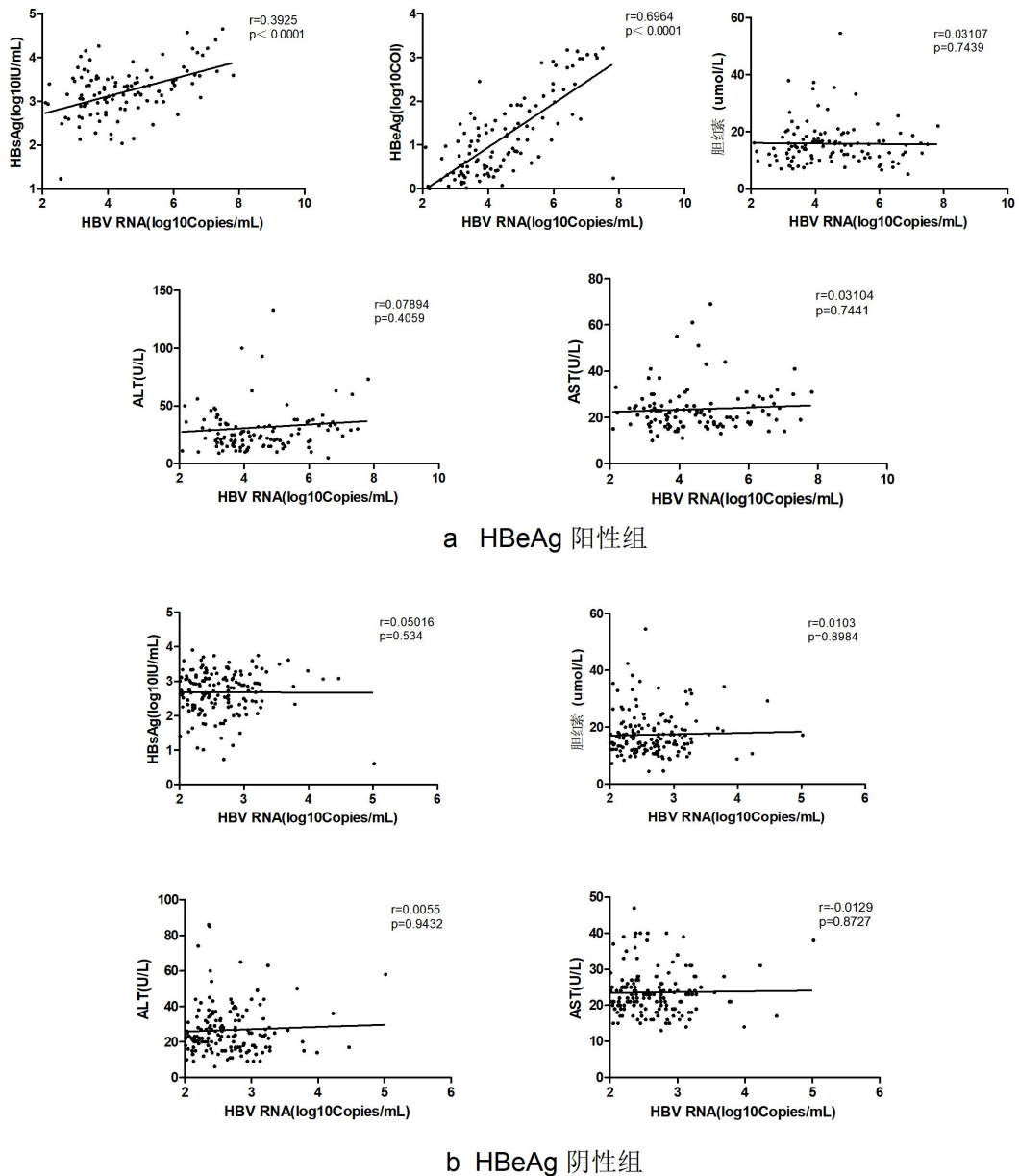


图 3 血清 HBV RNA 水平与其余各血清学指标的相关性

Fig 3 Correlation between serum HBV RNA levels and other serological indicators

3.5 不同 HBeAg 状态下未接受治疗的慢性 HBV 感染者与接受长期 NAs 治疗的 CHB 患者的血清 HBV RNA 水平

为探究 NAs 治疗对于肝内病毒复制活性的影响,我们纳入 93 例未接受抗病毒治疗的慢性 HBV 感染患者,根据 HBeAg 状态分为 HBeAg 阳性组(n=52)和 HBeAg 阴性组 (n=41), 分别比较不同 HBeAg 状态之下未接受治疗的慢性 HBV 感染患者与接受规律 NAs 治疗的 CHB 患者体内血清 HBV RNA 水平, 结果见图 4。无论 HBeAg 状态, 未接受治疗的慢性 HBV 感染者血清 HBV RNA 水平均显著高于口服 NAs 药物治疗的 CHB 患者 (均 $P < 0.05$)。

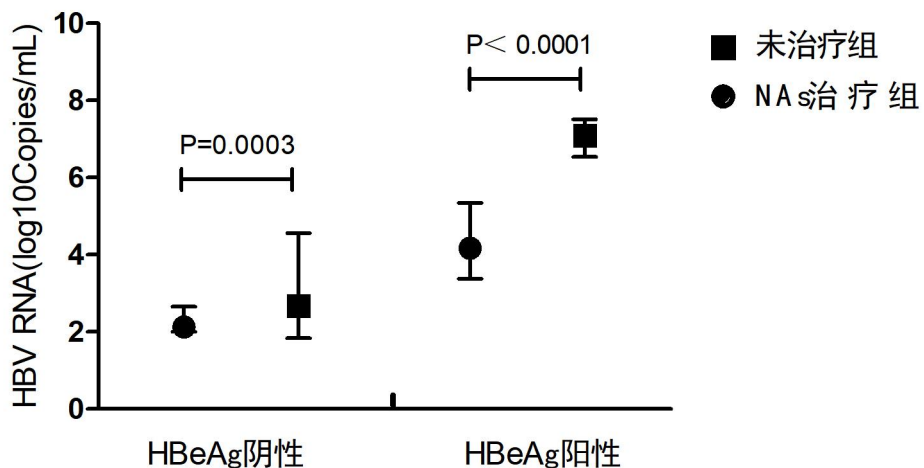


图 4 未接受治疗的慢性感染者与接受治疗的 CHB 患者血清 HBV RNA 水平

Fig 4 Serum HBV RNA levels in untreated chronically infected patients and NAs treated CHB patients

4 讨论

口服核苷酸类似物 (NAs) 为慢性乙型肝炎治疗中应用最广泛的抗病毒方案, 可显著降低 HBV DNA 水平, 改善患者预后。NAs 抗病毒机制为作用于乙肝病毒

复制周期中的逆转录过程，没有直接清除肝内 cccDNA 的作用，并且对复制周期上游的转录过程无影响；肝内 cccDNA 的存在及持续转录使得患者达到持续 DNA 受抑后仍然具有肝脏疾病继续进展的风险，往往需要长年的抗病毒治疗。在治疗过程中定期监测抗病毒疗效、评估病毒复制状态、寻找安全的治疗终点是临床工作的重点。因为肝内 cccDNA 检测为有创操作，实现难度大，长期以来，我们使用血清中的 HBV DNA 及 HBsAg 作为替代标志物用于疾病监测。但已有多项研究发现^[14,17-19]，NAs 虽然可阻碍子代 HBV DNA 的合成，但对于整合于宿主细胞的病毒 DNA 持续稳定地产生 HBsAg 基本无影响，使得这两种传统的血清学标志物不再适用于评估接受口服药物治疗的 CHB 患者的疾病状态，临床上需要一种能够较好反映 cccDNA 水平、受核苷酸类似物影响小且临床容易获取的新型血清学指标来指导 NAs 药物治疗。

HBV RNA 自偶然地被德国学者 Köck 等在 CHB 患者的血清中检出后^[21]，其来源、性质以及在临床中的应用就为众学者所关注。血清 HBV RNA 的来源已得到充分的研究。在 Wang 等的研究^[29]中，血清中的 HBV RNA 通过准种分析的方法被证明与肝内的 pgRNA 具有遗传上的同质性。肝内 pgRNA 是经 cccDNA 转录合成的长 3.5kb 的 mRNA，可作为复制周期下游步骤 DNA 合成的模板。在子代 DNA 链合成过程为：利用病毒的逆转录酶合成负链 DNA，在 DNA 聚合酶的作用下，以负链 DNA 作为模板合成正链 DNA，共同组成新的 HBV rcDNA；新合成的 rcDNA 一部分与病毒蛋白组装，成为新的完整的 HBV 病毒颗粒，继续感染健康的肝细胞，一部分通过核衣壳进入细胞核，补充细胞核中的 cccDNA 池，成为 HBV 感染慢性化的主要原因。在此经典的 HBV 复制周期之外，Wang 等发现^[26]有未参与逆转录的 pgRNA 直接经核衣壳包裹，以病毒样粒子的形式释放出细胞外，成为外周血中的 HBV RNA；Jansen 等的研究^[30]使用洗涤剂处理 CHB 患者的血浆样本以去除病毒颗粒包膜，结果显示在经预处理的血清样本中可检测出更多的 HBV pgRNA，进一步证实了 HBV RNA 是以含 pgRNA 的病毒样颗粒的形式存在于外周血中。这一发现从理论上证实了血清 HBV RNA 病毒样颗粒的存在，及其检测在反映 cccDNA 转录活性方面的价值。同时，由于 pgRNA 的形成未经过逆转录生成子代病毒 DNA

负链的过程，NAs 对于 pgRNA 的产生、与核衣壳装配、以病毒样粒子的形式释放的这一过程均无直接抑制作用，因此在 NAs 抗病毒治疗过程中，相较于传统的血清学指标，HBV RNA 可能有更好的反映病毒活性、评估抗病毒疗效的作用。然而，临床研究发现，血清 HBV RNA 水平与 cccDNA 定量的相关性并不稳定。Gao 等在一项针对于 HBeAg 阳性的 CHB 患者的研究^[31]中发现，在接受 NAs 治疗 96 周后，肝内 cccDNA 载量与血清 HBV RNA 水平无明显相关。在另一项同样针对接受 NAs 长期治疗患者的研究^[29]中，尽管与既往研究结果类似，血清 HBV RNA 与肝内 cccDNA 无明确相关性，但是以肝内 pgRNA 与 cccDNA 的比值代表 cccDNA 转录活性，血清 HBV RNA 水平展现出与 cccDNA 的良好相关性，提示与 cccDNA 载量不同，血清 HBV RNA 可以反映 cccDNA 复制状态及转录活性，由此可推断在评估疾病状态、指导用药及判断预后方面都具有一定的临床价值。尤其对于长期 NAs 治疗的患者，因为 HBV DNA 持续受抑而无法检测，血清 HBV RNA 有望成为可精确反映病毒活性的指标。一项纳入 142 例 CHB 患者的前瞻性研究^[32]显示，在 NAs 治疗且血清 HBV DNA 受抑并持续低于检测下限时，无论是否发生 HBeAg 的血清转换，血清 HBV RNA 都在部分 CHB 患者中可检测到，并且随访至 96 周时，依旧在部分患者血清中有可检出的 HBV RNA。这个结果表明长达 96 周的治疗并不足以完全抑制 HBV RNA 的产生，长期 NAs 治疗过程中，血清 HBV RNA 可能有替代 HBV DNA 成为反映疾病状态指标的能力。

基于以上对血清 HBV RNA 的了解，本研究旨在通过检测长期 NAs 治疗中，HBV DNA 持续受抑制的 CHB 患者不同治疗时间的血清 HBV RNA 水平，展示其阳性率、定量水平在 NAs 治疗的 CHB 患者病程中的变化，并分析及与其他血清学指标之间的关系，从而探究 NAs 抗病毒治疗不同时间的病毒转录水平及相关影响因素，评估 HBV RNA 定量检测在临床用药上的意义，进一步指导临床用药。

本研究纳入 395 例接受长期 NAs 治疗且已获得病毒学应答的 CHB 患者，根据 HBeAg 状态分为 HBeAg 阳性及 HBeAg 阴性两组，检测其血清 HBV RNA，比较两组之间的 HBV RNA 阳性率及定量水平。CHB 患者抗病毒治疗的过程中，HBeAg 的血清学转换是一个里程碑式的事件，标志着一定程度上的免疫控制，有望实现

长期病毒活性持续抑制，cccDNA 转录效率降低，HBV RNA 的生成减少，达到肝脏病变延缓甚至逆转、肝硬化及肝癌风险降低的治疗目标。既往一项涉及 50 名接受 NAs 治疗的 HBeAg 阳性 CHB 患者的研究^[28]表明，基线 HBV RNA 可以预测 HBeAg 的血清转换，并且预测效能优于 HBV DNA (AUROC=0.73 vs 0.67)，同时在接受抗病毒治疗期间，血清 HBV RNA 的下降也具有预测 HBeAg 血清转化的能力。与以上研究结果相符的是，在本文中，无论是 NAs 长期治疗的 CHB 患者（表 1）还是未服药的慢性 HBV 感染患者（图 4），HBeAg 阳性组相较于阴性组均表现出更高的血清 HBV RNA 水平。在 HBeAg 阳性组中，即使经过长期 NAs 治疗，仍可在所有患者体内检测出 HBV RNA，定量中位值为 4.17log₁₀Copies/mL，表明在长期治疗中，部分患者 HBeAg 血清学转换始终难以实现的原因与肝内 cccDNA 仍然具有较高转录活性相关，此时患者体内病毒复制活跃程度高，停药具有很大的病毒学复发及疾病反弹风险，需要更长期的抗病毒治疗；在 HBeAg 阴性患者中，有 55.32% 的患者检出 HBV RNA 阳性，定量中位值为 2.13log₁₀Copies/mL，证实无论 HBeAg 状态，在 HBV DNA 达到阴转后，血清 HBV RNA 仍有一定的检出率，可继续作为有效的治疗监测指标；由此可见，与 HBV DNA 相比，血清 HBV RNA 能更加灵敏且有效地反映病毒复制过程。另外，本研究中，HBeAg 阳性患者年龄小于 HBeAg 阴性患者，与杨建功等的研究^[33]得出的 HBeAg 阴性发生率与年龄有关的结果一致。

为探讨接受 NAs 治疗时间对 HBV RNA 水平的影响，将 HBeAg 不同状态的两组患者在组内按抗病毒治疗时间再次分组，比较不同抗病毒治疗时间的 HBV RNA 阳性率及水平，研究发现，在 HBeAg 阳性组内，按用药时间分组后，HBV RNA 不仅阳性率始终保持 100%，定量结果也呈一稳定高值（表 2、图 2），提示长时间的 NAs 治疗可能对 HBeAg 阳性患者体内病毒活性的抑制效果不突出。这个结果也可以用既往一项针对 HBeAg 阳性的 CHB 患者在 NAs 治疗下的血清 HBV RNA 的动力学研究^[34]解释，该研究发现，在 NAs 治疗期间，血清 HBV RNA 的下降呈两阶段变化：第一阶段 HBV DNA 可检测，此阶段血清 HBV RNA 呈快速下降，第二阶段 HBV DNA 不可检测，此时 HBV RNA 降低速度明显减慢，本研究纳入

患者均满足 HBV DNA 阴性，此阶段 HBV RNA 下降较前更加缓慢，可能是造成各组间 HBV RNA 水平及阳性率相近的原因。在 HBeAg 阴性组内，HBV RNA 在不同治疗时间的阳性率及定量水平具有差异，接受抗病毒治疗时间最短（1 年）组的 HBV RNA 水平最高，抗病毒治疗时间最长的 5 年组及 5 年以上组最低，且 1 年组与 5 年组、5 年以上组的定量水平之间均具有明显差异（表 2、图 2），且随抗病毒治疗时间延长，HBV RNA 阳性率也呈逐渐下降趋势（图 1）；进一步寻找与 HBV RNA 阳性检出相关的指标，单因素分析筛出用药时间、HBsAg 及胆红素三个相关因素，纳入二元 logistic 回归，结果表明接受治疗时间长及 HBsAg 水平低意味着 HBV RNA 阳性检出率低（表 3、4），表明在 HBeAg 阴性的 CHB 患者中，随着治疗时间的延长，HBV RNA 可缓慢下降。这可能是因为在长时间 NAs 治疗过程中，HBV rcDNA 的合成受阻，使得肝内 cccDNA 池的补充及其余正常肝细胞的感染受到影响，从而导致 pgRNA 合成的减少^[26]。2017 年发表于 J Hepatol 的一项研究^[35]证实了以上观点，研究者检测了 43 名长期接受 NAs 治疗的 CHB 患者的肝内 cccDNA 数量，发现大部分患者在长期治疗后出现了 cccDNA 数量的减少，提示长期 NAs 治疗对肝内 cccDNA 池的蓄积有负性影响。同样，Mak 等^[32]对 142 例 CHB 患者口服 NAs 治疗后的血清 HBV RNA 水平进行随访观察，发现在随访过程中，血清 HBV RNA 呈缓慢下降趋势。

本研究中对于未服药的慢性 HBV 感染患者与 NAs 治疗的 CHB 患者的 HBV RNA 定量水平的对比结果也支持长时间 NAs 治疗对肝内 cccDNA 池具有间接影响。对比结果显示无论 HBeAg 处于何种状态，未接受治疗的慢性感染者都表现出更高的 HBV RNA 水平，并且在 HBeAg 阳性组中差异更加明显（图 4）。与之相反的是，Wang 等在研究中使用 NAs 阻断体外细胞和转基因小鼠的 HBV 逆转录过程后，血清 HBV RNA 水平较前上升^[26]，另一项针对 NAs 用药前后 CHB 患者体内 HBV RNA 及其与 HBV DNA 之间的相对关系变化的研究也发现，CHB 患者血清中 HBV RNA 在接受 NAs 治疗后依旧存在且较治疗前升高^[27]。得到这种相反的结论可能是因为该研究选取的是初始进行 NAs 抗病毒治疗的患者，在 NA 治疗后的早期，由于 DNA 合成过程受损，转录得到的 pgRNA 积累并衣壳化形成病毒粒子

释放到循环中，会出现 HBV RNA 水平的升高，随着 NAs 治疗时间的延长，HBV RNA 的绝对含量会逐渐下降。

但是即使在 HBeAg 阴性组内，接受 >5 年的 NAs 治疗后依旧有 42.62% 的患者拥有可以定量的血清 HBV RNA，同样，在 Lai 等的研究中^[35]，接受规范的抗病毒治疗时间达 6 年以上时，在纳入患者中达到 cccDNA 无法检出的仅占 49%。说明 NAs 治疗对细胞内 cccDNA 的消耗是一个极其缓慢的过程。达到 cccDNA 完全耗竭或静默这一被称为“完全治愈”的理想状态在目前治疗方法下几乎不可能实现，临床上常常以“功能性治愈”，即血清中检测不到 HBV DNA 以及 HBsAg，作为抗病毒治疗的最理想终点。然而，在单以使用 NAs 治疗的 CHB 患者中，实现 HBsAg 转阴的比例依旧只有 5%~7%^[7,11]，部分患者终生难以实现功能性治愈，因此，如何提高 CHB 患者功能性治愈率及选择新的停药标准已成为 CHB 治疗领域的热点话题。

近年来，已有多项研究^[36-38]对 NAs 与干扰素（IFN）序贯联合治疗的临床治愈效果进行了探索，研究发现，NAs 经治的患者序贯有限疗程的 IFN 治疗可显著提高 HBsAg 清除率，并且在筛选出的优势患者中可以获得更高的临床治愈率，优势患者指满足 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA 水平低、在治疗过程中 HBsAg 指标下降幅度较大。对于相关指标的临界值的探索，NEW SWITCH 研究^[37]和另一项涉及 88 例患者的小型研究^[38]都发现，HBsAg 水平 < 1500IU/ml 可实现更高的 HBsAg 清除率，提示 HBsAg 水平 1500IU/ml 可能可以作为 IFN 治疗的优势人群的筛选标准。前文通过对影响 HBeAg 阴性组中 HBV RNA 的阳性检出率的因素进行二元 logistic 分析，已经证明低 HBsAg 水平意味着 HBV RNA 阳性率低，基于以上的事实，首先将 HBeAg 阴性组患者根据 HBsAg 水平是否 < 1500IU/ml 分组，对比两组之间的 HBV RNA 阳性率，遗憾的是两组间阳性率并无明显差异；于是进一步以 HBsAg 水平将 HBeAg 患者分为 HBsAg 低水平（HBsAg < 500IU/ml）、中水平（HBsAg 500IU/ml~1500IU/ml）、高水平（HBsAg > 1500IU/ml）三组，比较三组的 HBV RNA 阳性率，结果显示 HBV RNA 阳性率在三组中的差异有统计学意义，并且 HBsAg 低水平组的阳性率（32.72%）要显著低于中水平组（60.12%）及高水平组（62.96%）；

这种差异说明在 HBsAg 低于 1500IU/ml 的优势人群中，也许可以进行进一步精确划分寻找到更适宜 IFN 序贯治疗的人群，这个精确划分的标准可以是更低的 HBsAg 水平，也可以是 HBV RNA 检测阴性，有待更多的研究来验证。

新的停药标准的选择也是国内外所关心的问题。在抗病毒治疗过程中，HBeAg 发生血清转化及 HBsAg 转阴是两个具有重要意义的事件。HBeAg 血清转化被认为是 HBsAg 丢失或血清转化的先决条件，但尽管 HBeAg 的阴转代表着 HBV 感染得到一定缓解，病毒复制活性及病毒蛋白产生并未得到有效抑制，并不能作为停止治疗的良好时机。欧洲肝脏病协会（EASL）的临床实践指南（2017 年版）以及我国《慢性乙型肝炎防治指南》（2019 年版）共同推荐的停药时机为：达到 HBV DNA 阴性、ALT 正常以及 HBeAg 转阴后，继续巩固治疗 3 年以上，期间每半年进行一次随访复查，HBV DNA、ALT 及 HBeAg 保持以上状态者可考虑停药；然而，此时患者肝细胞核内 cccDNA 并未被清除，并且持续具有转录活性，存在 HBV 再激活及疾病复发的风险。在 Wang 等的一项研究^[26]中，研究者对 33 例已达上述停药标准的 CHB 患者进行 24 周的随访，发现至随访终点时，共有 24 例患者发生病毒学反弹，其中停止治疗时血清 HBV RNA 检测阳性的患者全部出现复发。抗病毒治疗的最佳的停药时机为功能性治愈（临床治愈），即满足 HBsAg 消失（伴有或不伴有血清学转换），此时停药最为安全。但如上所述，治疗后出现 HBsAg 消失的患者比例极低；同时，整合于宿主细胞上的 HBV DNA 作为 HBsAg 的稳定来源，甚至在 cccDNA 耗竭或者转录活性沉默时，仍然可以继续产生 HBsAg^[35]。以功能性治愈作为治疗终点，不仅大部分患者难以达到停药，并且部分患者可能会进行不必要的药物治疗。与 HBsAg 不同的是，HBV RNA 水平被认为基本不受已整合的基因组的影响。理论上说，HBV RNA 的来源仅有 cccDNA 的转录。肝内 cccDNA 为 HBV 感染慢性化及停药后复发的主要原因，HBV RNA 与 cccDNA 的良好相关性提示 HBV RNA 对于定义停药标准、判断停药预后的重要价值。Fan 等^[24]对于停药后复发的预测指标的研究发现，血清 HBV RNA 与 HBV DNA 联合使用可能具有更好的预测效能。该研究通过 Cox 回归分析证明，停药时 HBV RNA 及 DNA 水平（阳性/双阴）是临床或病毒学复发的最强独立预测因子，联合使用血清 HBV RNA

及 DNA 相较于单用其中一种指标具有更好的预测效果。因 HBV RNA 展现出来的在筛选适合停药人群及检测停药效果方面的价值,我国学者鲁凤鸣等^[39]提出了“准临床治愈”概念:将 HBV RNA 纳入,重新定义停药标准,达到 HBV DNA 和 HBV RNA 双阴性称为“部分治愈”,此时 NAs 停药后复发或病毒学反弹的风险较小,在此基础上加上血清 HBsAg 低水平称为“准临床治愈”,以此为新的停药标准,也许是 CHB 患者摆脱终生服药、战胜病毒的希望。本研究所纳入患者已达到 HBV DNA 阴性, HBeAg 阳性患者 HBV RNA 均为阳性,不满足“部分治愈”的基础条件; HBeAg 阴性组中有部分患者达到 HBV RNA 检出阴性,此类患者表现出更低的 HBsAg 水平及更长的治疗时间,但本研究并未进一步探究其停药后复发风险;未来的研究可在此基础上将 HBeAg 阴性组患者以 HBV RNA 状态(阳性、阴性)分组,探究 HBV RNA 与 HBV DNA 双阴性患者相较于 HBV DNA 单阴性组在 NAs 停药后的病毒学复发率是否有所差别。

同时,本文分析了 HBV RNA 与其他血清学指标之间的相关性(图 3), HBeAg 阳性组中, HBV RNA 水平与 HBeAg 水平之间呈显著正相关,与 HBsAg 之间呈弱于 HBeAg 的正相关,证明在此类患者中,表明血清 HBV RNA 水平能较准确反应 CHB 患者体内病毒的复制状态,并且此时相较于 HBsAg, HBeAg 是更合适的评估疾病状态的指标,与彭亚梦等的研究^[40]结果一致;而 HBeAg 阴性组中, HBV RNA 定量水平与 HBsAg 之间无明显相关,这个结果与一项涉及 388 例未治疗患者的研究^[32]结果相似,该研究中, HBeAg 阳性患者血清中 HBV RNA 与 HBsAg 有一定相关性,然而在 HBeAg 阴性的患者中无明显相关。说明这种相关性结果可能不受治疗影响,主要与 HBeAg 抗原状态有关。由于慢性炎症过程中 HBV DNA 片段在宿主细胞上的整合, HBsAg 并不能很好地反映肝组织内 cccDNA 活性^[4,16]。其余肝功能指标, ALT 主要存在于肝细胞的细胞质, AST 主要存在于肝细胞的线粒体,在肝细胞受到损伤后才能释放入血,而胆红素反映的是肝脏的转化功能,由于在 CHB 时肝脏的损伤主要来源于 HBV 诱导的体内免疫反映,病毒自身的复制活动并不直接损伤肝细胞,所以在 HBeAg 不同状态的两组中, HBV RNA 与 ALT、AST 及胆红素等肝功能指标之间均无相关性。

尽管血清 HBV RNA 在 CHB 的疾病监测方面的作用已经得到充分的证实,但也有研究者指出,单一使用血清 HBV RNA 或许不是反映肝内 cccDNA 的最优指标。针对 HBeAg 阳性的 CHB 患者的一项研究^[31]发现,在未治疗时,肝内 cccDNA 水平与血清中的 HBV RNA 水平呈弱于血清 HBV DNA 的正相关($r=0.25, P=0.02$),而且在接受 96 周的 NAs 治疗后,肝内 cccDNA 水平与血清 HBV RNA 水平已经无明显相关;将血清 HBV RNA 水平进一步联合 HBV DNA 水平共同作为一个预测因子,在 Huang 等的研究^[42]中发现,在 HBeAg 阳性的 CHB 患者中,血清 HBV RNA 联合 HBV DNA 反映肝内 cccDNA 水平的效能优于单用 HBV RNA,相关系数分别为 0.412、0.363。同时,另一项对 111 名接受恩替卡韦治疗的 CHB 患者的研究^[43]提示,血清 HBV RNA 与 HBeAg 的组合在预测 HBeAg 血清转换方面的效能优于单独使用 HBV RNA。所以,血清 HBV RNA 和其他血清学指标相结合可能是更准确地评估病毒状态及抗病毒疗效的方法。在本研究中,HBeAg 阳性组与 HBeAg 阴性组患者在 HBV RNA 水平及阳性率上均有显著差异,并且在 HBeAg 阳性组中,血清 HBV RNA 与 HBeAg、HBsAg 均呈显著正相关;在 HBeAg 阴性组中,尽管 HBV RNA 与各血清学指标无线性相关,但 HBsAg 被证实是 HBV RNA 阳性的独立影响因素,进一步联合血清 HBV RNA 以及 HBeAg、HBsAg 等指标可能具有更好的评估抗病毒疗效的能力。

综上所述,血清 HBV RNA 作为近年来备受关注的新型血清学指标,与 cccDNA 转录活性的良好相关性已得到多方研究证实。我们通过对接受 NAs 治疗不同年限的 HBV DNA 阴性 CHB 患者血清 HBV RNA 的检测及相关分析,发现此类患者中,即使 HBV DNA 低于检测下限,部分患者的血清 HBV RNA 仍可检测到,证明此时体内肝炎病毒仍具有活性,停药具有很大的疾病复发风险,需要更长时间的药物治疗;HBeAg 是否发生血清转换是个重要节点,HBeAg 阳性患者具有更高的病毒活性,并且对于 HBeAg 阳性的 CHB 患者,HBeAg 相较于 HBsAg 具有更好的疾病监测价值;持续、规范的抗病毒治疗可以使得体内 HBV RNA 得到缓慢下降,这一点在 HBV DNA 阴性患者中尤为明显,HBsAg 高是导致 HBV RNA 检出阳性的危险因素,在抗病毒治疗中血清 HBV RNA 可以进一步联合 HBeAg 及 HBsAg

来评估疗效、判断预后、确定停药时机及指导临床用药。

本研究的优势在于从不同治疗年限出发,展现了接受 NAs 治疗不同年限的血清 HBV RNA 水平的变化,并评估了影响血清 HBV RNA 水平的因素,从一定程度上表明了 NAs 抗病毒治疗过程中,尤其 HBV DNA 低于检测下限时,血清 HBV RNA 检测的临床意义,对 NAs 经治患者下一步治疗方案的选择、停药时机的判断及进一步临床研究提供了一定的数据基础。局限性在于缺乏肝脏活检测量肝内 cccDNA 的数据,以进一步探究 HBV RNA 与肝脏病理损伤的相关性。其次,只有横断面数据,缺乏具有强烈因果关系的队列研究来支持 NAs 治疗中 HBV RNA 的变化特点。并且缺少进一步干扰素治疗药物的研究,无法证明 NAs 序贯干扰素治疗过程中,HBV RNA 水平对预后的影响。

5.结论

长期接受 NAs 治疗且 HBV DNA 低于检测下限后,血清 HBV RNA 仍可检测到,HBsAg 阳性患者有更高的 HBV RNA 阳性检出率及定量水平;HBsAg 阴性时,NAs 治疗时间和 HBsAg 水平是 HBV RNA 检出阳性的影响因素,长治疗时间、低水平 HBsAg 会降低 HBV RNA 阳性率;HBsAg 阳性患者中 HBsAg 及 HBeAg 水平与 HBV RNA 水平相关。

参考文献

- [1]Robinson WS, Lutwick LI. The virus of hepatitis, type B (first of two parts). N Engl J Med. 1976;295(21):1168-1175.
- [2]Nguyen MH, Wong G, Gane E, Kao JH, Dusheiko G. Hepatitis B Virus: Advances in Prevention, Diagnosis, and Therapy. Clin Microbiol Rev. 2020;33(2):e00046-19. Published 2020 Feb 26.
- [3]刘瑞霞,潘修成,耿建等.血清 HBV RNA 检测的临床价值[J].临床肝胆病杂志,2017,33(11):2196-2199.
- [4]Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of

- chronic hepatitis B. *Gut*. 2015;64(12):1972-1984.
- [5]Liu J, Liang W, Jing W, Liu M. Countdown to 2030: eliminating hepatitis B disease, China. *Bull World Health Organ*. 2019;97(3):230-238.
- [6]Stanaway JD, Flaxman AD, Naghavi M, et al. The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2016;388(10049):1081-1088.
- [7]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].中华肝脏病杂志,2019,27(12):938-961.
- [8]Vourli G, Papatheodoridis G, Raptopoulou M, et al. Association of antiviral therapy with reduced disease progression in chronic Hepatitis B patients: Results from a nation-wide cohort study. *Hippokratia*. 2016;20(3):214-221.
- [9]Marcellin P, Gane E, Buti M, et al. Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. *Lancet*. 2013;381(9865):468-475.
- [10]Jang J W,Choi J Y,Kim Y S,et al.Long-term effect of antiviral therapy on disease course after decompensation in patients with hepatitis B virus-related cirrhosis[J].*Hepatology*,2015,61(6):1809-1820.
- [11]European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu; European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2017;67(2):370-398.
- [12]孙蓓蓓.IFN- α 和PEG-IFN- α 治疗慢性乙肝的作用机制[J].国际检验医学杂志,2012,33(23):2887-2889.DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.23.033.
- [13]Keating GM. Peginterferon-alpha-2a (40 kD): A review of its use in chronic hepatitis B. *Drugs*. 2009;69(18):2633-2660.
- [14]Dusheiko G. Treatment of HBeAg positive chronic hepatitis B: interferon or nucleoside analogues. *Liver Int*. 2013;33 Suppl 1:137-150.

- [15]Yeo YH, Ho HJ, Yang HI, et al. Factors Associated With Rates of HBsAg Seroclearance in Adults With Chronic HBV Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology*. 2019;156(3):635-646.e9.
- [16]田原,任锋.乙型肝炎病毒共价闭合环状 DNA(cccDNA)检测和清除的研究进展 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*,2019,39(11):875-879.DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-5101.2019.11.011.
- [17]Grossi G, Viganò M, Loglio A, Lampertico P. Hepatitis B virus long-term impact of antiviral therapy nucleot(s)ide analogues (NUCs). *Liver Int*. 2017;37 Suppl 1:45-51.
- [18]Larsson SB, Malmström S, Hannoun C, Norkrans G, Lindh M. Mechanisms downstream of reverse transcription reduce serum levels of HBV DNA but not of HBsAg in chronic hepatitis B virus infection. *Virology*. 2015;12:213. Published 2015 Dec 9.
- [19]Lam YF, Seto WK, Wong D, et al. Seven-Year Treatment Outcome of Entecavir in a Real-World Cohort: Effects on Clinical Parameters, HBsAg and HBcrAg Levels. *Clin Transl Gastroenterol*. 2017;8(10):e125. Published 2017 Oct 26.
- [20]Höner Zu Siederdisen C, Maasoumy B, Cornberg M. What is new on HBsAg and other diagnostic markers in HBV infection?. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2017;31(3):281-289.
- [21]Köck J, Theilmann L, Galle P, Schlicht HJ. Hepatitis B virus nucleic acids associated with human peripheral blood mononuclear cells do not originate from replicating virus. *Hepatology*. 1996;23(3):405-413.
- [22]Jones SA, Hu J. Hepatitis B virus reverse transcriptase: diverse functions as classical and emerging targets for antiviral intervention. *Emerg Microbes Infect*. 2013;2(9):e56.
- [23]Liu S, Zhou B, Valdes JD, Sun J, Guo H. Serum Hepatitis B Virus RNA: A New Potential Biomarker for Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Hepatology*.

- 2019;69(4):1816-1827.
- [24]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 Nucleos(t)ide Analogue Therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2020;18(3):719-727.e7.
- [25]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. *Antivir Ther.* 2015;20(4):369-375.
- [26]Wang J, Shen T, Huang X, et al. Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound. *J Hepatol.* 2016;65(4):700-710.
- [27]Butler EK, 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. *Hepatology.* 2018;68(6):2106-2117.
- [28]van Bömmel F, Bartens A, Mysickova A, et al. Serum hepatitis B virus RNA levels as an early predictor of hepatitis B envelope antigen seroconversion during treatment with polymerase inhibitors [published correction appears in *Hepatology.* 2016 Jan;63(1):349]. *Hepatology.* 2015;61(1):66-76.
- [29]Wang J, Yu Y, Li G, et al. Relationship between serum HBV-RNA levels and intrahepatic viral as well as histologic activity markers in entecavir-treated patients [published online ahead of print, 2017 Sep 21]. *J Hepatol.* 2017;S0168-8278(17)32261-4.
- [30]Jansen L, Kootstra NA, van Dort KA, Takkenberg RB, Reesink HW, Zaaijer HL. Hepatitis B Virus Pregenomic RNA Is Present in Virions in Plasma and Is Associated With a Response to Pegylated Interferon Alfa-2a and Nucleos(t)ide Analogues. *J Infect Dis.* 2016;213(2):224-232.
- [31]Gao Y, Li Y, Meng Q, Zhang Z, Zhao P, Shang Q, et al. Serum hepatitis B virus

- DNA, RNA, and HBsAg: which correlated better with intrahepatic covalently closed circular dna before and after nucleos(t)ide analogue treatment? *J Clin Microbiol* 2017;55:2972-2982.
- [32]Mak LY, Cloherty G, Wong DK, et al. HBV RNA Profiles in Patients With Chronic Hepatitis B Under Different Disease Phases and Antiviral Therapy [published correction appears in *Hepatology*. 2021 Dec;74(6):3561]. *Hepatology*. 2021;73(6):2167-2179.
- [33]杨建功, 黄兵, 钱健帮, 等. 乙型肝炎 e 抗原阴性慢性乙型肝炎发生率与年龄关系的临床分析 [J]. *临床荟萃*, 2008, 23 (7): 502-503. DOI: 10.3969/j.issn.1004-583X.2008.07.021.
- [34]Liu S, Liu Z, Li W, et al. Factors associated with the biphasic kinetics of serum HBV RNA in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B treated with nucleos(t)ide analogues. *Aliment Pharmacol Ther*. 2020;52(4):692-700.
- [35]Lai CL, Wong D, Ip P, et al. Reduction of covalently closed circular DNA with long-term nucleos(t)ide analogue treatment in chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 2017;66(2):275-281.
- [36]Ning Q, Han M, Sun Y, et al. Switching from entecavir to PegIFN alfa-2a in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised open-label trial (OSST trial). *J Hepatol*. 2014;61(4):777-784.
- [37]Hu P, Shang J, Zhang W, et al. HBsAg Loss with Peg-interferon Alfa-2a in Hepatitis B Patients with Partial Response to Nucleos(t)ide Analog: New Switch Study. *J Clin Transl Hepatol*. 2018;6(1):25-34.
- [38]He LT, Ye XG, Zhou XY. Effect of switching from treatment with nucleos(t)ide analogs to pegylated interferon α -2a on virological and serological responses in chronic hepatitis B patients. *World J Gastroenterol*. 2016;22(46):10210-10218.
- [39]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*

- 志,2017,25(2):105-110.DOI:10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2017.02.005.
- [40]彭亚梦,袁浩,周毅峰等.低水平乙型肝炎病毒 DNA 慢性乙型肝炎患者血清乙型肝炎病毒 RNA 水平及其影响因素研究 [J]. 中国全科医学,2019,22(18):2217-2222.DOI:10.12114/j.issn.1007-9572.2019.00.020.
- [41]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. *Hepatology*. 2018;68(3):839-847.
- [42]Huang H, Wang J, Li W, et al. Serum HBV DNA plus RNA shows superiority in reflecting the activity of intrahepatic cccDNA in treatment-naïve HBV-infected individuals. *J Clin Virol*. 2018;99-100:71-78.
- [43]Wang X, Wang Z, Chi X, et al. Efficacy of a combination of HBV RNA and HBeAg in predicting HBeAg seroconversion in patients treated with entecavir for 144 weeks. *Int J Infect Dis*. 2020;99:171-178.

综述

血清 HBV RNA 检测在慢性乙型肝炎抗病毒治疗中的应用价值

摘要

HBV cccDNA 在受感染肝细胞中的存在是乙型肝炎慢性化、难以治愈的主要原因。血清中的 HBV RNA 被证明是 cccDNA 转录产物释放入血，在一定程度上反映肝细胞内 cccDNA 的活性，可作为乙型肝炎的新型血清标志物用于临床抗病毒治疗指导。本文就血清 HBV RNA 在慢性乙型肝炎抗病毒治疗中的应用价值进行综述。

关键词：HBV RNA；慢性乙型肝炎；抗病毒治疗；前基因组 RNA

Value of serum HBV RNA detection in antiviral therapy of chronic hepatitis B

Abstract

The presence of HBV cccDNA in infected hepatocytes is the main reason that hepatitis B to be chronic and difficult to cure. HBV RNA in serum has been proved to be the release of cccDNA transcription product into blood, which reflects the activity of cccDNA in liver cells. It can be used as a new serum marker of hepatitis B for clinical antiviral therapy. This article reviews the application value of serum HBV RNA in antiviral therapy of chronic hepatitis B.

Key words: HBV RNA; chronic hepatitis B; antiviral therapy; pgRNA

慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 是由乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 所引起的肝脏慢性炎症性疾病, 可进一步发展为肝衰竭、肝硬化及肝细胞肝癌等终末期肝病, 是全球性的公共卫生问题。我国的慢性乙型肝炎疾病负担重, 据估计, 慢性 HBV 感染者大约有七千万例, 其中 CHB 患者大约有两千万到三千万例^[1]。

抗 HBV 治疗是 CHB 最重要的治疗措施, 可有效延缓肝脏疾病进展, 降低终末期肝病和其他并发症的发生率^[2]。目前临床上的一线用药主要有干扰素类 (interferon, IFN) 以及核苷酸类似物类 (nucleos(t)ide analogue, NAs) ^[2-3]。IFN 具有抗病毒和免疫调节两方面作用, 可以在有限的疗程中达到 HBeAg 或 HBsAg 的血清转换, 但对受治疗人群有限制, 且不良反应较多; NAs 作用于 HBV 的逆转录过程, 可快速清除血清中的 HBV DNA, 但停药后复发率高, 往往需终身服药^[4]。受药物作用和病毒基因整合的影响, 目前临床应用的抗病毒治疗的监测指标如 HBsAg、HBeAg、HBV DNA, 都很难准确反映肝脏病情、评估疾病预后^[4-5]。近期研究发现, 血清 HBV RNA 实为 HBV 复制周期中的前基因组 RNA (pregenomic RNA, pgRNA), 来源于 cccDNA 的直接转录, 理论上可反映肝内 cccDNA 的转录活性, 并且来源不受 NAs 及 IFN 的直接影响^[6-7], 有望成为更精确地评估抗病毒疗效以及预测停药后复发的新型血清学指标。本文将对血清 HBV RNA 的来源、与相关血清学指标的关系及在 CHB 抗病毒治疗中的可能应用价值进行综述。

1. HBV RNA 的来源

HBV 是属于嗜肝病毒科的 DNA 病毒, 基因组为一长度约 3.5kb 的部分双链环状 DNA^[8]。在 HBV 感染过程中, 病毒通过与肝细胞膜上的受体牛磺胆酸钠共转运蛋白 (NTCP) 结合进入肝细胞, 在肝细胞内脱去核衣壳形成松弛环状 DNA (rcDNA), rcDNA 在肝细胞核进行折叠、扭转等过程, 以负链 DNA 为模板形成具有稳定超螺旋结构的共价闭合环状 DNA (cccDNA) ^[8-9]。cccDNA 是病毒在肝细胞内复制周期的起始模板, 持续存在的 cccDNA 为 CHB 迁延不愈、停药后

易复发的主要原因。以 HBV cccDNA 作为转录模板,可转录出长度为 3.5kb、2.4kb、2.1kb、0.7kb 的 4 种 mRNA。其中长度为 3.5kb 的 mRNA 可作为子代 HBV DNA 合成中的逆转录过程的模板,又被称之为前基因组 RNA(pregenomic RNA, pgRNA)。以 pgRNA 为模板逆转录生成的子代基因组,一部分与病毒蛋白进行装配后形成新的完整 HBV 病毒颗粒,一部分通过再次进入细胞核内,补充肝内的 cccDNA 池^[9]。

在 1996 年,德国学者 Köck 等^[10]首次在 CHB 患者的血清中检测出 HBV RNA 的存在。随后,血清中 HBV RNA 的来源一直是国内外的热点问题。Wang 等^[7]通过多种方法对 11 例 NAs 初治的 CHB 患者血清中 HBV RNA 进行检测,证实外周血中的 HBV RNA 实为肝内没有或部分逆转录的 pgRNA 直接被包裹并释放入血而来;同年发表于 J Hepatol 的一项研究^[6]也通过准种分析的方法确定了血清 HBV RNA 与肝内的 pgRNA 在遗传上的同质性;在 Jansen 等的研究^[11]中,研究者使用洗涤剂处理 CHB 患者的血浆样本以去除病毒颗粒包膜,结果显示在经处理的血清样本中可检测出更多的 HBV RNA,进一步证实了血清 HBV RNA 是以含 pgRNA 的病毒样颗粒的形式存在于外周血中。这一发现是对 HBV 生命周期的认识的重要补充,血清 HBV RNA 来源从理论上肯定了其对于肝内病毒活性及用药后疗效检测的价值。

近年来,血清 HBV RNA 的检测方法已取得一定进展,目前检测 HBV RNA 的方法主要包括 cDNA 末端扩增(RACE)、荧光核酸恒温扩增试验(SAT)、定量反转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)、逆转录液滴数字聚合酶链反应(RT-ddPCR)及 QuantiGene 测定技术^[12]。但目前国内外还没有血清 HBV RNA 检测的标准化方法,可应用于临床的准确可靠的 HBV RNA 检测方法仍有待进一步的开发。

2. 血清 HBV RNA 在抗病毒治疗中的应用

2.1 血清 HBV RNA 与 cccDNA 的关系

由于肝内 cccDNA 是体内 HBV 复制持续、感染慢性化及停药后复发的主要原因，因此，找到可以精准反映 cccDNA 水平及转录活性的血清学指标具有重要意义。对血清 HBV RNA 来源的研究证实了外周血中的 RNA 实际上为肝内的 pgRNA 释放入血而来，理论上说，血清中 HBV RNA 病毒样颗粒的水平具有反映肝内 cccDNA 的转录活性的价值。

Gao 等在一项针对于 HBeAg 阳性的 CHB 患者的研究^[13]中发现，未治疗时，虽然肝内 cccDNA 水平与血清中的 HBV RNA 水平呈正相关 ($r=0.25$, $P=0.02$)，但是这一相关性较其与血清 HBV DNA 水平的相关性 ($r=0.36$, $P<0.01$) 弱，而且在接受 NAs 治疗 96 周后，肝内 cccDNA 水平与血清 HBV RNA 水平无明显相关；Wang 等的研究^[6]进一步以肝内 pgRNA 与 cccDNA 的比值作为 cccDNA 转录活性的代表，发现在接受抗病毒治疗的 CHB 患者中，血清 HBV RNA 水平与肝内 pgRNA/cccDNA 的比值呈密切相关。所以，血清 HBV RNA 一定程度上可以反映肝内 cccDNA 的存在和复制活性，虽然反映 cccDNA 载量的效果不佳，但无论治疗前后，血清 HBV RNA 始终可反映 cccDNA 的转录活性。

2.2 血清 HBV RNA 反映抗病毒疗效的价值

在抗病毒治疗中，HBeAg 的血清学转换是一个里程碑式的事件，意味着病毒复制活性显著下降，CHB 患者在一定程度上获得了免疫控制，有望实现病毒活性持续抑制的目标。一项包含 727 名 HBeAg 阳性的非肝硬化 CHB 患者的多中心队列研究^[14]发现，在聚乙二醇干扰素 (PEG IFN α) 治疗过程中，第 12 周的 HBV RNA 水平是 HBeAg 血清学转换的早期预测指标，并且预测效能显著优于其他血清病毒标志物。另一项涉及 50 名 NAs 治疗患者的研究^[16]也表明，基线 HBV RNA 可以预测 HBeAg 的血清转换，并且预测效能优于 HBV DNA (AUROC=0.73 vs 0.67)，同时在接受抗病毒治疗期间，血清 HBV RNA 的下降也具有预测 HBeAg 血清转化能力，并且相对于血清 HBV DNA 及 HBsAg 有更好的预测效能。

Yu 等人的研究^[15]进一步对比了 NAs 单药治疗与单用 IFN 治疗之间的 HBV RNA 预测效能,结果表明无论是在恩替卡韦单药治疗还是 PEG IFN α 治疗下,血清 HBV RNA 对 CHB 患者发生 HBeAg 血清转换都有良好的预测能力,其中,接受恩替卡韦治疗的患者在治疗第 4 周时的 HBV RNA 水平预测效能最佳,AUROC=0.88,而接受 PEG IFN α 治疗的患者是在 24 周时血清 HBV RNA 水平预测效果最佳,AUROC=0.74,表明在 NAs 中,血清 HBV RNA 对于 HBeAg 血清转换方面的预测价值更高。该研究也发现,PEG IFN α 治疗组中较恩替卡韦治疗组中获得 HBeAg 血清学转换的比例更高(15.3% vs 36.3%),且与恩替卡韦治疗组相比,PEG IFN α 治疗组无论是否获得 HBeAg 血清学转换,治疗后 HBV RNA 的水平下降幅度均高于治疗前。这中差异可能是两种药物抗病毒机制及对 HBV RNA 的作用不一样造成的,具体的机制及影响有待进一步的发掘。

血清 HBV RNA 联合其他血清学指标可能比单一使用拥有更好的预测抗病毒应答的效能。Wang 等的一项研究^[19]纳入共 111 例接受恩替卡韦治疗的 CHB 患者,结果显示,虽然基线及治疗第 24 周的 HBV RNA 水平被证明对 HBeAg 发生血清转换具有预测价值,但是在第 24 周时 HBV RNA 及 HBeAg 联合使用表现出更好的预测性能(AUROC 0.821 vs 0.754)。提示血清 HBV RNA 与 HBeAg 相结合在 HBeAg 血清转换的预测方面优于单独使用血清 HBV RNA。

因此,基线或抗病毒治疗过程中,血清 HBV RNA 及其治疗后的变化对于 HBeAg 血清转换具有一定的预测能力,意味着其在反映抗病毒疗效上有一定的价值,并且与 HBeAg 等指标相结合可能具有更好的预测效果。但未来 HBV RNA 在抗病毒治疗疗效评价中的具体应用尚需要更多研究。

2.3 预测停药后复发

血清 HBV RNA 与 cccDNA 具有良好相关性,而且在低 HBV DNA 的患者中仍可检测到,可以识别停药时肝内 cccDNA 转录活性低的病人,筛选可安全停药

的人群。2019年版的《慢性乙型肝炎防治指南》提出，NAs药物治疗推荐的治疗终点为：HBV DNA 阴性、ALT 正常以及 HBeAg 转阴后，巩固治疗3年以上，连续半年一次随访上述指标保持不变。在 Wang 等人的研究^[7]中，对33例已达上述停药标准的 CHB 患者进行达24周的随访，结果显示在治疗结束时 HBV RNA 阳性的21例患者均出现病毒学反弹，而在 HBV RNA 阴性的患者中仅有25%出现反弹，提示停药时的血清 HBV RNA 状态及水平是预测停药后复发的潜在指标。另一项研究^[17]也得出了相似的结论。该研究纳入64例接受 NAs 治疗的 CHB 患者，停药后随访一年，比较病毒学复发组与未复发组在停药时的相关血清学指标，结果显示停药时 HBV RNA 阳性是影响病毒学复发的独立危险因素。

上述研究已证明，单用血清 HBV RNA 对 CHB 患者停药后复发有一定预测价值。近期，Fan 等^[20]对于停药后复发的预测指标的研究发现，血清 HBV RNA 与 HBV DNA 联合使用可能具有更好的预测效能。该研究通过 Cox 回归分析证明，停药时 HBV RNA 及 DNA 水平（阳性/双阴）是临床或病毒学复发的最强独立预测因子，联合使用血清 HBV RNA 及 DNA 相较于单用其中一种指标具有更好的预测效果。考虑到 HBV RNA 在筛选适合停药人群方面的价值，我国学者鲁凤鸣等^[21]提出了“准临床治愈”概念：将 HBV RNA 纳入，重新定义停药标准，达到 HBV DNA 和 HBV RNA 双阴性称为“部分治愈”，此时 NAs 停药后复发或病毒学反弹的风险较小，在此基础上加上血清 HBsAg 低水平称为“准临床治愈”，以此为新的停药标准，也许是 CHB 患者摆脱终生服药、战胜病毒的希望。

因此，停药时血清 HBV RNA 水平可预测停药后复发，停药时 HBV RNA 阳性患者具有更高的复发风险；将血清 HBV RNA 与 HBV DNA 同时阴性、HBsAg 低水平定义为“准临床治愈”，以此为基础的停药终点的重新选择可能会优化未来 CHB 的临床诊疗，但仍需在实践中加以验证。

3. 总结展望

血清 HBV RNA 实为 HBV cccDNA 的转录产物 pgRNA, 具有反映肝细胞内 cccDNA 的转录活性的巨大潜力。不同于传统的血清学标志物, 如 HBV DNA、HBsAg、HBeAg, 血清 HBV RNA 作为乙型肝炎的新型血清标志物, 受抗病毒药物影响较小, 在抗病毒治疗过程中, 有预测 HBeAg 血清学转换、反映药物疗效、预测停药后复发及选择合适的停药时机的作用。在临床上, 将血清 HBV RNA 结合其他血清学指标, 纳入抗病毒疗效评价体系及治疗终点的选择, 可能具有推动诊疗措施优化、影响临床治疗方向的重要意义。但是, 血清 HBV RNA 在临床应用中, 是否可取代现有指标、成为具有指导意义的标志物, 仍需更大规模的系统性研究证据佐证。同时, 现暂无标准化的方法检测血清 HBV RNA, 血清 HBV RNA 应用于临床上的可行性仍有待更多方法学上的发展与突破。

参考文献

- [1] Liu J, Liang W, Jing W, Liu M. Countdown to 2030: eliminating hepatitis B disease, China. *Bull World Health Organ.* 2019;97(3):230-238.
- [2] 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]. *中华肝脏病杂志*, 2019, 27(12):938-961
- [3] European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu; European Association for the Study of the Liver. *EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection.* *J Hepatol.* 2017;67(2):370-398.
- [4] Dusheiko G. Treatment of HBeAg positive chronic hepatitis B: interferon or nucleoside analogues. *Liver Int.* 2013;33 Suppl 1:137-150.
- [5] Höner Zu Siederdisen C, Maasoumy B, Cornberg M. What is new on HBsAg and other diagnostic markers in HBV infection?. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2017;31(3):281-289.
- [6] Wang J, Yu Y, Li G, et al. Relationship between serum HBV-RNA levels and intrahepatic viral as well as histologic activity markers in entecavir-treated patients

- [published online ahead of print, 2017 Sep 21]. *J Hepatol.* 2017;S0168-8278(17)32261-4.
- [7] Wang J, Shen T, Huang X, et al. Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound. *J Hepatol.* 2016;65(4):700-710.
- [8] Robinson WS, Lutwick LI. The virus of hepatitis, type B (first of two parts). *N Engl J Med.* 1976;295(21):1168-1175.
- [9] Nguyen MH, Wong G, Gane E, Kao JH, Dusheiko G. Hepatitis B Virus: Advances in Prevention, Diagnosis, and Therapy. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(2):e00046-19. Published 2020 Feb 26.
- [10] Köck J, Theilmann L, Galle P, Schlicht HJ. Hepatitis B virus nucleic acids associated with human peripheral blood mononuclear cells do not originate from replicating virus. *Hepatology.* 1996;23(3):405-413.
- [11] Jansen L, Kootstra NA, van Dort KA, Takkenberg RB, Reesink HW, Zaaijer HL. Hepatitis B Virus Pregenomic RNA Is Present in Virions in Plasma and Is Associated With a Response to Pegylated Interferon Alfa-2a and Nucleos(t)ide Analogues. *J Infect Dis.* 2016;213(2):224-232.
- [12] 王丽娟,许宏涛. 血清 HBV RNA 检测的临床意义及方法学进展[J]. 分子诊断与治疗杂志,2022,14(02):181-184+188.
- [13] Gao Y, Li Y, Meng Q, Zhang Z, Zhao P, Shang Q, et al. Serum hepatitis B virus DNA, RNA, and HBsAg: which correlated better with intrahepatic covalently closed circular dna before and after nucleos(t)ide analogue treatment? *J Clin Microbiol* 2017;55:2972-2982.
- [14] Zhang M, Li G, Shang J, et al. Rapidly decreased HBV RNA predicts responses of pegylated interferons in HBeAg-positive patients: a longitudinal cohort study. *Hepatol Int.* 2020;14(2):212-224.
- [15] Yu XQ, Wang MJ, Yu DM, et al. Comparison of Serum Hepatitis B Virus RNA

- Levels and Quasispecies Evolution Patterns between Entecavir and Pegylated-Interferon Mono-treatment in Chronic Hepatitis B Patients. *J Clin Microbiol.* 2020;58(9):e00075-20. Published 2020 Aug 24.
- [16] van Bommel F, Bartens A, Mysickova A, Hofmann J, Kruger DH, Berg T, et al. Serum hepatitis B virus RNA levels as an early predictor of hepatitis B envelope antigen seroconversion during treatment with polymerase inhibitors. *Hepatology* 2015;61:66-76.
- [17] Wang FD, Zhou J, Li LQ, et al. Serum Pregenomic RNA Combined With Hepatitis B Core-Related Antigen Helps Predict the Risk of Virological Relapse After Discontinuation of Nucleos(t)ide Analogs in Patients With Chronic Hepatitis B. *Front Microbiol*, 2022, 13: 901233.
- [18] Fan R, Peng J, Xie Q, et al. Combining Hepatitis B Virus RNA and Hepatitis B Core-Related Antigen: Guidance for Safely Stopping Nucleos(t)ide Analogues in Hepatitis B e Antigen-Positive Patients With Chronic Hepatitis B. *J Infect Dis.* 2020;222(4):611-618.
- [19] Wang X, Wang Z, Chi X, et al. Efficacy of a combination of HBV RNA and HBeAg in predicting HBeAg seroconversion in patients treated with entecavir for 144 weeks.
- [20] 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 Nucleos(t)ide Analogue Therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2020;18(3):719-727.e7.
- [21] 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.DOI:10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2017.02.005.