

HBVRNA在慢乙肝中临床应用的研究进展

颜涛*, 易建华#

华中科技大学同济医学院附属协和医院, 湖北 武汉

收稿日期: 2022年12月28日; 录用日期: 2023年1月21日; 发布日期: 2023年1月31日

摘要

血清中的HBVRNA是肝细胞内共价环状闭合DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA)的直接转录体, 其实质是核衣壳内未经转录的前基因组RNA (pregenomic RNA, pgRNA), 转而以病毒颗粒样的方式释放进入血液循环, 形成“HBV RNA颗粒”。近年来许多研究表明HBV RNA在监测抗病毒治疗效果、指导停药及预测复发、预测HBeAg血清学转换等方面有重要作用, 是慢性乙型病毒性肝炎的一种潜在的新兴病毒学标志物。

关键词

HBVRNA, 慢乙肝, 血清标志物

Research Progress in the Clinical Application of HBV RNA in Chronic Hepatitis B

Tao Yan*, Jianhua Yi#

Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan Hubei

Received: Dec. 28th, 2022; accepted: Jan. 21st, 2023; published: Jan. 31st, 2023

Abstract

HBV RNA in serum is a direct transcript of covalently closed circular DNA (cccDNA) in liver cells. Its essence is untranslated pregenomic RNA (pgRNA) in the nucleocapsid, which is released into the blood circulation in a virus particle like manner, forming “HBV RNA particles”. In recent years, many studies have shown that HBV RNA plays an important role in monitoring the effect of anti-

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 颜涛, 易建华. HBVRNA 在慢乙肝中临床应用的研究进展[J]. 临床医学进展, 2023, 13(1): 899-903.

DOI: 10.12677/acm.2023.131130

viral therapy, guiding drug withdrawal, predicting relapse, and predicting HBeAg seroconversion. It is a potential emerging viral marker of chronic hepatitis B.

Keywords

HBVRNA, Chronic Hepatitis B, Serum Marker

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 背景

慢性乙型病毒性肝炎(Chronic Hepatitis B, CHB)是导致肝功能衰竭、肝硬化和肝细胞癌的主要病因之一。在全球范围内,约 2.5 亿人患有慢性 HBV 感染,每年有近 100 万人死于慢性乙型肝炎所导致的相关并发症。[1] [2]目前抗乙型病毒性肝炎的治疗主要是通过(聚乙二醇)干扰素和核苷(酸)类似物(NA)两类药物来实现,但由于肝细胞核内持续存在的 cccDNA,这两种抗病毒治疗都不能使慢乙肝达到完全治愈,[3] [4]而只能追求临床治愈,即停止治疗后仍保持 HBsAg 阴性(伴或不伴抗-HBs 出现)、HBV DNA 检测不到、肝脏生物化学指标正常、肝脏组织病变改善。想要准确测出感染肝细胞内的 cccDNA 水平必须进行肝活检,由于这是一个侵袭性操作,且 HBV cccDNA 在肝内呈不均匀分布,无法在临床上常规开展。近年来的研究表明,血清中的 HBV RNA 直接来源于 cccDNA,可以较好地反应 cccDNA 水平,这使得它成为了判断乙型肝炎病毒感染、治疗和预后新兴的病毒学标志物。

2. HBV RNA 的来源

HBV 属嗜肝病毒科(Hepatophilidae),是一种小的 DNA 包膜病毒,其生命周期始于病毒粒子与肝细胞受体牛磺胆酸钠共转运多肽(Sodium taurocholate cotransporting polypeptide Stcp)结合,然后含有病毒松弛环状 DNA (Relaxed circular DNA, RcDNA)的核衣壳释放到肝细胞,接着 RcDNA 被转运到细胞核,在那里它通过一系列尚未完全了解的机制被转化为 cccDNA。[5] CccDNA 作为转录模板,转录成 4 种不同功能的 RNA,其中就包括能翻译 HBcAg 和 HBV 聚合酶的 pgRNA [6]。pgRNA 在细胞质中和 HBV 聚合酶一起与核心蛋白结合形成核衣壳,并在核衣壳内进行逆转录产生 rcDNA,含有 rcDNA 的成熟核衣壳与细胞多泡体处的病毒包膜结合,分泌后代病毒颗粒,或是被运回细胞核形成 cccDNA。[7]

3. 血清 HBV RNA 的检测技术

由于 cccDNA 的检测需要进行肝活检,无法在临床上常规展开,自从研究表明 HBVRNA 与 cccDNA 相关性好,可直接反映 cccDNA 的活性后,如何快速准确地检测 HBVRNA 一直是世界范围内研究人员关注的重点问题。目前 HBV RNA 检测方法主要是 cDNA 末端扩增(Rapid Amplification of eDNA Ends, RACE)、荧光核酸恒温扩增试验(Simultaneous Amplification Testing, SAT)、定量反转录-聚合酶链反应(Quantitative reverse transcription-Polymerase Chain Reaction, Qrt-PCR)、逆转录液滴数字聚合酶链反应(Reverse Transcriptase droplet digital Polymerase Chain Reaction, RT-ddPCR)等技术。其中 RACE 技术是基于 PCR 技术基础上由已知的一段 cDNA 片段,利用锚式 PCR,快速扩增 cDNA 末端从而获得已知 mRNA 内一段小序列与 3'或 5'的 cDNA 序列技术,其出现时间早,但只能检测带 poly A 尾的 RNA。SAT 则是

将新一代的核酸恒温扩增技术和实时荧光检测技术相结合的一种新型核酸检测技术, 具有扩增效率高、反应时间短、反应条件简单、操作简便、高灵敏度、高特异性、低污染、反应稳定等优点。qRT-PCR 是利用针对 HBVpgRNA 序列设计的一对接头引物和一条特异性荧光探针(TaqMan 探针), 实现对 HBVpgRNA 的定量检测, 被许多的临床检验分子诊断公司所采用。RT-ddPCR 是统聚合酶链反应(PCR)方法的改进, 由于 RT-ddPCR 的绝对定量不需要校准曲线, 在低病毒载量的 HBeAg 阴性感染者中, RT-ddPCR 技术可以提高血清 HBV RNA 检测的灵敏度和特异性[8] [9]。需要指出的是目前尚无标准化的血清 HBVRNA 检测方法, 需要进一步的基础研究和检测, 如 Northern 印迹和单分子 RNA 直接测序等, 以加深对血清 HBVRNA 分子生物学的认识, 从而有助于建立准确可靠的血清 HBVRNA 检测方法。

4. HBV RNA 的临床应用价值

4.1. HBV RNA 反映抗病毒疗效

许多研究已经表明, 血清 HBVRNA 可以作为监测抗病毒治疗(如 NAS 和干扰素- α)疗效的有用标记物[10] [11] [12] [13]。一项对 52 例接受 NAS 治疗的慢性乙型肝炎患者的研究表明, 治疗 12 周时血清 HBVRNA 水平低可以预测初始病毒学应答。[13]大部分 CHB 患者在接受长期抗病毒治疗后, HBVDNA 就会阴转或是处于低病毒血症状态, 而 HBVRNA 可以作为一个有效的指标代替 HBVDNA 来反映 cccDNA 的转录活性。[14] [15] [16]

4.2. HBV RNA 可以指导 NAS 停药及评估停药后复发风险

核苷(酸)类似物(NAS)是目前主流的两种抗病毒治疗的药物之一, 主要通过直接抑制乙型肝炎病毒复制, 快速降低 HBVDNA 载量来达到抗病毒效果, 但其诱导的免疫应答持续时间不长且停药后容易复发, 如何安全停用 NAs 仍是尚待研究和解决的问题。不少研究都表明 HBV RNA 病毒颗粒可能是监测 NA 治疗安全中断的潜在生物标志物。[17] [18]最近四川大学华西医院的一项研究表明 HBV pgRNA ≤ 50 拷贝/ml 组比 HBV pgRNA 阴性组停药后复发的风险高 2.316 倍(HR = 2.316, 95% CI: 1.047~5.126, P = 0.038)。HBV-pgRNA > 50 拷贝/ml 组停药后复发的风险是 HBV-pgRNA 阴性组的 3.45 倍(HR = 3.450, 95% CI: 1.338~8.892, P = 0.010), 即停药前血清 HBV pgRNA 阴性的患者停药后复发风险相对较低, HBV pgRNA > 50 拷贝/ml 的患者不推荐停药。[19]从理论上讲, 血清 HBVRNA 最有希望的临床应用领域是对复发和持续应答的预测, 特别是停药后 HBsAg 的丢失。然而, 需要更大样本量的额外研究来进一步评估 HBV RNA 在预测 HBV 复发和停用 NAS 治疗后的持续应答中的作用。

4.3. HBV RNA 可以预测 HBeAg 血清学转换

HBeAg 血清学转换是指既往 HBeAg 阳性的患者 HBeAg 消失, 抗-HBe 出现, 是抗病毒治疗的重要中间结果。有研究表明在 NAS 治疗 48 周后仍保持 HBV pgRNA 阳性的患者未达到 HBeAg 清除的风险增加, 需要更多时间来实现 HBeAg 清除和不可检测的 HBV DNA 负荷。[20] [21]一项接受 96 个月核苷酸类似物治疗的慢性乙型肝炎患者研究提示基线血清 pgRNA 可作为 NAs 治疗期间 HBeAg 血清转换的新预测因子。[22]而另一项针对慢乙型肝炎儿童治疗的研究提示第 12 周和第 24 周的 HBV RNA 水平显示出良好的预测 HBeAg 血清转换的能力(ROC 评分下面积 > 0.85, P < 0.001)。[23]也有研究表明在用聚乙二醇干扰素治疗慢乙肝时治疗第 12 周和第 24 周的 HBV RNA 水平显示出良好的预测 HBeAg 血清转换的能力(ROC 评分下面积 > 0.75, P < 0.001)。HBV RNA 截止值 > 5.5 log₁₀ 拷贝/mL 在第 12 周时鉴定出 30% 的无应答者(阴性预测值 > 90%)。[12]但目前研究样本较小, 有待于今后大样本 HBeAg 血清转换患者的研究进一步验证。

5. 总结

综上所述, 血清 HBVRNA 有可能成为慢性乙型肝炎病毒感染的新标志物。越来越多的证据支持其在反映抗病毒疗效、评估 NAS 停药后复发风险等方面有重要作用, 并可能成为接受 NAS 治疗的病毒抑制患者中 cccDNA 活性更好的替代标志物。虽然不同研究的血清 HBVRNA 检测方法不同, 但已显示出初步的临床意义。因此, 需要进行更广泛的研究, 以进一步确定血清 HBVRNA 的分子生物学特征, 并评估其临床潜力。

参考文献

- [1] Wu, Y., Wen, J., Xiao, W. and Zhang, B. (2019) Pregenomic RNA: How to Assist the Management of Chronic Hepatitis B? *Reviews in Medical Virology*, **29**, e2051. <https://doi.org/10.1002/rmv.2051>
- [2] Valery, P.C., Laversanne, M., Clark, P.J., Petrick, J.L., McGlynn, K.A. and Bray, F. (2018) Projections of Primary Liver Cancer to 2030 in 30 Countries Worldwide. *Hepatology*, **67**, 600-611. <https://doi.org/10.1002/hep.29498>
- [3] Lucifora, J., Xia, Y., Reisinger, F., Zhang, K., Stadler, D., Cheng, X., *et al.* (2014) Specific and Nonhepatotoxic Degradation of Nuclear Hepatitis B Virus cccDNA. *Science*, **343**, 1221-1228. <https://doi.org/10.1126/science.1243462>
- [4] Wang, J., Xu, Z.W., Liu, S., Zhang, R.Y., Ding, S.L., Xie, X.M., *et al.* (2015) Dual gRNAs Guided CRISPR/Cas9 System Inhibits Hepatitis B Virus Replication. *World Journal of Gastroenterology*, **21**, 9554-9565. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i32.9554>
- [5] Hong, X., Kim, E.S. and Guo, H. (2017) Epigenetic Regulation of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA: Implications for Epigenetic Therapy against Chronic Hepatitis B. *Hepatology*, **66**, 2066-2077. <https://doi.org/10.1002/hep.29479>
- [6] Sun, S., Nakashima, K., Ito, M., Li, Y., Chida, T., Takahashi, H., *et al.* (2017) Involvement of PUF60 in Transcriptional and Post-Transcriptional Regulation of Hepatitis B Virus Pregenomic RNA Expression. *Scientific Reports*, **7**, Article No. 12874. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12497-y>
- [7] Diogo Dias, J., Sarica, N. and Neuveut, C. (2021) Early Steps of Hepatitis B Life Cycle: From Capsid Nuclear Import to cccDNA Formation. *Viruses*, **13**, Article No. 757. <https://doi.org/10.3390/v13050757>
- [8] Kojabad, A.A., Farzanehpour, M., Galeh, H.E.G., Dorostkar, R., Jafarpour, A., Bolandian, M., *et al.* (2021) Droplet Digital PCR of Viral DNA/RNA, Current Progress, Challenges, and Future Perspectives. *Journal of Medical Virology*, **93**, 4182-4197. <https://doi.org/10.1002/jmv.26846>
- [9] Limothai, U., Chuaypen, N., Poovorawan, K., Chotiyaputta, W., Tanwandee, T., Poovorawan, Y., *et al.* (2020) Reverse Transcriptase Droplet Digital PCR vs Reverse Transcriptase Quantitative Real-Time PCR for Serum HBV RNA Quantification. *Journal of Medical Virology*, **92**, 3365-3372. <https://doi.org/10.1002/jmv.25792>
- [10] Jansen, L., Kootstra, N.A., van Dort, K.A., Takkenberg, R.B., Reesink, H.W. and Zaaijer, H.L. (2016) 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. *The Journal of Infectious Diseases*, **213**, 224-232. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv397>
- [11] van Bömmel, F., Bartens, A., Mysickova, A., Hofmann, J., Krüger, D.H., Berg, T. and Edelmann, A. (2015) Serum Hepatitis B Virus RNA Levels as an Early Predictor of Hepatitis B Envelope Antigen Seroconversion during Treatment with Polymerase Inhibitors. *Hepatology*, **61**, 66-76. <https://doi.org/10.1002/hep.27381>
- [12] van Bömmel, F., van Bömmel, A., Krauel, A., Wat, C., Pavlovic, V., Yang, L., *et al.* (2018) Serum HBV RNA as a Predictor of Peginterferon Alfa-2a Response in Patients With HBeAg-Positive Chronic Hepatitis B. *The Journal of Infectious Diseases*, **218**, 1066-1074. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy270>
- [13] Huang, Y.-W., Takahashi, S., Tsuge, M., Chen, C.-L., Wang, T.-C., Abe, H., *et al.* (2015) On-Treatment Low Serum HBV RNA Level Predicts Initial Virological Response in Chronic Hepatitis B Patients Receiving Nucleoside Analogue Therapy. *Antiviral Therapy*, **20**, 369-375. <https://doi.org/10.3851/IMP2777>
- [14] Pan, J., Xu, J., Luo, H., Tan, N., Kang, Q., Chen, H., *et al.* (2021) Factors and Virological Significance of Hepatitis B Virus Pregenomic RNA Status after 5 Years of Antiviral Therapy. *International Journal of Infectious Diseases*, **105**, 418-423. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.02.116>
- [15] Wang, Y., Liu, Y., Liao, H., Deng, Z., Bian, D., Ren, Y., *et al.* (2022) Serum HBV DNA plus RNA Reflecting cccDNA Level before and during NAs Treatment in HBeAg Positive CHB Patients. *International Journal of Medical Sciences*, **19**, 858-866. <https://doi.org/10.7150/ijms.71737>
- [16] Lin, N., Ye, A., Lin, J., Liu, C., Huang, J., Fu, Y., *et al.* (2020) Diagnostic Value of Detection of Pregenomic RNA in

-
- Sera of Hepatitis B Virus-Infected Patients with Different Clinical Outcomes. *Journal of Clinical Microbiology*, **58**. <https://doi.org/10.1128/JCM.01275-19>
- [17] Wang, J., Shen, T., Huang, X., Kumar, G.R., Chen, X., Zeng, Z., *et al.* (2016) Serum Hepatitis B Virus RNA Is Encapsidated Pregenome RNA That May Be Associated with Persistence of Viral Infection and Rebound. *Journal of Hepatology*, **65**, 700-710. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.029>
- [18] Fan, R., Zhou, B., Xu, M., Tan, D., Niu, J., Wang, H., *et al.* (2020) Association between Negative Results from Tests for HBV DNA and RNA and Durability of Response after Discontinuation of Nucleos(t)ide Analogue Therapy. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **18**, 719-727. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2019.07.046>
- [19] He, J.Z., Xu, Y.F. and Lei, X.Z. (2022) [Clinical Significance of Hepatitis B Virus pgRNA for Deciding Antiviral Therapy Discontinuation in Patients with Chronic Hepatitis B]. *Chinese Journal of Hepatology*, **30**, 970-975. (In Chinese)
- [20] Luo, H., Tan, N., Kang, Q., Pan, J., Chen, H., Xi, H., *et al.* (2020) Hepatitis B Virus Pregenomic RNA Status Can Reveal the Long-Term Prognoses of Chronic Hepatitis B Patients Treated with Nucleos(t)ide Analogues. *Journal of Viral Hepatitis*, **27**, 323-328. <https://doi.org/10.1111/jvh.13227>
- [21] Wang, M.-L., Liao, J., Ye, F., Tao, Y.-C., Wu, D.-B., He, M., *et al.* (2021) Distribution and Factors Associated with Serum HBV Pregenomic RNA Levels in Chinese Chronic Hepatitis B Patients. *Journal of Medical Virology*, **93**, 3688-3696. <https://doi.org/10.1002/jmv.26529>
- [22] Tao, Y., Wang, M., Liao, J., Cheng, X., He, M., Zhang, D., *et al.* (2022) Dynamics of Serum Pregenome RNA in Chronic Hepatitis B Patients Receiving 96-Month Nucleos(t)ide Analog Therapy. *Frontiers in Medicine*, **9**, Article ID: 787770. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.787770>
- [23] Wu, Y., Wen, J., Tang, G., Zhang, J. and Xin, J. (2021) On-Treatment HBV RNA Dynamic Predicts Entecavir-Induced HBeAg Seroconversion in Children with Chronic Hepatitis B. *The Journal of Infection*, **83**, 594-600. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.08.044>