

文章编号 1006-8147(2021)05-0520-04

论著

血清 HBV RNA 在慢性乙型肝炎抗病毒治疗过程中的动态变化及其临床意义

张荣芳¹, 钱磊¹, 常明杰¹, 付兵利², 郭利敏³

(1.中国人民解放军陆军第八十三集团军医院检验科, 新乡 453000; 2.北京市朝阳区恒兴肿瘤医院检验科, 北京 100020; 3.新乡市中心医院检验科, 新乡 453000)

摘要 目的:探讨血清 HBV RNA 在慢性乙型肝炎(CHB)抗病毒治疗过程中的动态变化及其临床意义。方法:慢性乙型肝炎患者 62 例采用恩替卡韦抗病毒治疗,分别在第 0、7、14、30 天以及第 2、3、6、9、12 个月来本院进行随访, TaqMan 探针法定量检测 HBV RNA 水平,采用实时荧光定量 PCR 法进行 HBV DNA 水平检测,采用化学发光法进行 HBsAg 和 HBeAg 检测,采用酶法进行 ALT 及 AST 检测。**结果:**血清 HBV RNA 水平随着治疗时间的延长呈下降趋势,治疗 3 个月后下降速度趋缓,从 9 个月后变化不大。血清 HBV RNA 水平从 0 d 到 6 个月间,各个相邻监测点间变化均有统计学意义(均 $P < 0.05$),在治疗 6~12 个月两个时间点间差异无统计学意义($P > 0.05$)。HBeAg(+)患者基线血清 HBV RNA 与 HBV DNA($r_s = 0.68, P < 0.05$)、HbsAg($r_s = 0.64, P < 0.05$)、HBeAg($r_s = 0.77, P < 0.05$)均强相关。在治疗前 6 个月各时间点,HBV RNA 与 HBV DNA 呈强相关($r_s > 0.5, P < 0.05$)。HBV RNA 与 HBsAg 在治疗前 3 个月呈强相关($r_s > 0.5, P < 0.05$),治疗 6~9 个月时为弱相关($r_s = 0.23, P = 0.31; r_s = 0.28, P = 0.23$)。HBV RNA 与 HBeAg 水平在各治疗时间点均为强相关($r_s > 0.5, P < 0.05$)。HBeAg(-)患者在治疗 30 d 时血清 HBV RNA 与 HBV DNA 呈正相关($r_s = 0.62, P < 0.05$),在治疗 14 d 时 HBV RNA 与 HBsAg 水平呈正相关($r_s = 0.60, P < 0.05$)。**结论:**抗病毒治疗时,慢性乙型肝炎患者血清 HBV RNA 水平随着治疗时间的延长呈下降趋势。患者血清 HBV RNA 水平与血清 HBV DNA、HBsAg、HBeAg 在治疗前和治疗初期有明显相关性,随着治疗时间延长,其相关性逐渐减弱。

关键词 乙型肝炎病毒;抗病毒治疗;HBV RNA;共价闭合环状 DNA中图分类号 R512.6²

文献标志码 A

Dynamic changes and clinical significance of serum HBV RNA in patients with chronic hepatitis B during antiviral therapy

ZHANG Rong-fang¹, QIAN Lei¹, CHANG Ming-jie¹, FU Bing-li², GUO Li-min³

(1. Department of Clinical Laboratory, 83rd Army Group Military Hospital, The People's Liberation Army of China, Xinxiang 453000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Huanxing Cancer Hospital, Chaoyang District of Beijing, Beijing 100020, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Xinxiang Central Hospital, Xinxiang 453000, China)

Abstract Objective: To investigate the dynamic changes and clinical significance of serum HBV RNA in patients with chronic hepatitis B (CHB) during antiviral therapy. **Methods:** A total of 62 patients with chronic hepatitis B were treated with Entecavir, the patients were followed up at 0, 7, 14, 30 days and 2, 3, 6, 9, 12 months. Quantitative detection of HBV RNA was conducted by TaqMan probe, HBV DNA level was detected by real-time fluorescent quantitative PCR, HBsAg and HBeAg were detected by chemiluminescence, ALT and AST were detected by enzymatic. **Results:** The serum HBV RNA level showed a downward trend with the extension of treatment time, and the decline rate slowed down after 3 months of treatment, and there was little change after 9 months. The changes of serum HBV RNA between the adjacent monitoring points were all statistically significant (all $P < 0.05$) from 0 day to 6 months. There was no significant difference between the two time points of 6-12 months ($P > 0.05$). Serum HBV RNA in patients with HBeAg(+) was strongly correlated with HBV DNA ($r_s = 0.68, P < 0.05$), HbsAg ($r_s = 0.64, P < 0.05$), HbeAg ($r_s = 0.77, P < 0.05$) in the cardinal line. There was a strong correlation between HBV RNA and HBV DNA during 6 months of treatment ($r_s > 0.50, P < 0.05$). The correlation between HBV RNA and HBsAg was strong during 3 months treatment ($r_s > 0.50, P < 0.05$), and it was weak from 6 to 9 months during treatment ($r_s = 0.23, P = 0.31; r_s = 0.28, P = 0.23$). The correlation between HBV RNA and HBeAg level was strong at each treatment time point ($r_s > 0.50, P < 0.05$). The correlation between serum HBV RNA and HBV DNA in HbeAg(-) patients at 30 days of treatment was positive ($r_s = 0.62, P < 0.05$), and the correlation between HBV RNA and HBsAg level at 14 days of treatment was positive ($r_s = 0.60, P < 0.05$). **Conclusion:** During antiviral treatment, the serum HBV RNA level of patients with chronic hepatitis B decreases with the extension of treatment time. There is a significant correlation between serum HBV RNA level and serum HBV DNA, HBsAg, HBeAg before and at the beginning of treatment. With the extension of treatment time, the correlation is gradually weakened.

Key words HBV; antiviral therapy; HBV RNA; covalently closed circular DNA

作者简介 张荣芳(1982-),女,主管技师,硕士,研究方向:病原生物学;通信作者:钱磊, E-mail: 112690653@qq.com。

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)是由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染引起的肝脏损害性慢性传染疾病,其进一步发展可出现肝硬化、肝衰竭、肝癌等严重肝病,严重危害人类健康^[1]。目前我国 HBsAg 流行率依然处于中度流行区^[2]。近年来抗病毒治疗是 CHB 治疗的最关键措施,对抑制病毒复制、改善肝功能、修复肝损伤具有重要意义^[3-4]。抗病毒治疗用药、何时停药、疗效预测是目前医学界的研究热点。HBV RNA 是长度 3.5 kb 的 RNA,是乙肝病毒颗粒的核心成分,由肝细胞核中的 HBV cccDNA 转录而来,存在于患者血清中,其水平对用药与停药安全性具有临床指导意义^[5-6]。本文旨在研究血清 HBV pgRNA 在 CHB 治疗过程中的动态变化及其临床意义。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取本院 2018 年 11 月—2019 年 11 月期间 CHB 患者 62 例,其中男性 32 例,女性 30 例,年龄 22~68 岁,平均年龄(40.60±14.36)岁。诊断标准符合《慢性乙型肝炎防治指南(2019 年版)》^[7]。HbeAg(+)患者 40 例,HbeAg(-)患者 22 例,两组患者在年龄、性别差异无统计学意义($P>0.05$)。所有慢性乙肝患者血清学检测 HBsAg 阳性,HBV DNA $>10^4$ IU/mL,谷丙转氨酶(ALT)大于上限值 2 倍以上。排除标准:丙型肝炎、酒精性肝炎、自身免疫性肝炎、肝硬化;恶性肿瘤及结核患者;已进行抗病毒治疗患者;妊娠或哺乳患者;不配合随访者。所有患者均签订知情同意。

表 1 CHB 患者临床资料($\bar{x}\pm s, M(P_{25}, P_{75})$)

Tab 1 Clinical data of patients with CHB($\bar{x}\pm s, M(P_{25}, P_{75})$)

指标	HBeAg(+)(n=40)	HBeAg(-)(n=22)	P
年龄(岁)	39.13±12.38	43.26±15.22	0.17
性别(男/女)	23/17	9/13	0.21
HBV RNA(copies/mL)	7.82±1.71	5.92±1.36	<0.001
HBV DNA(copies/mL)	7.94±0.94	6.81±0.75	<0.001
HBsAg(IU/mL)	4.28(3.63, 4.78)	3.5(3.08, 3.86)	0.02
HBeAg(S/Co)	1 137.24(298.13, 1 583.29)	NA	NA

注:CHB:慢性乙型肝炎;NA:不适用;S/Co:S 与 cut 值的比值;HBV RNA 和 HBV DNA:log 转换值;HBsAg:log 转换值的中位数,HBeAg:中位数

2.2 患者血清 HBV RNA 水平变化趋势 全部入组的患者血清 HBV RNA 水平随着治疗时间的延长呈下降趋势,从治疗后 2 周到 3 个月期间,下降速度最快,治疗 3 个月后下降速度趋缓,从 9 个月后变化不大,进入平台期,见图 1。

从 0 d 到 6 个月间,各个相邻监测点间患者血清 HBV RNA 变化均有统计学意义(0 d vs. 7 d, $P=0.03$; 7 d vs. 14 d, $P<0.001$; 14 d vs. 30 d, $P<0.001$; 30 d vs. 2 个月, $P<0.001$; 2 个月 vs. 3 个月, $P<0.001$;

1.2 治疗方法 入组后所有患者采用恩替卡韦(北京协和药厂,国药准字 H20153254)抗病毒治疗,口服 0.5 mg/d。治疗 3 个月和 6 个月时检测 HBV DNA,评估治疗效果。3 个月时 HBV DNA 较 0 d 时下降,小于 $1 \log_{10}$ copies/mL,或者 6 个月时 HBV DNA 检测为阳性,更换用药,应用福韦酯进行抗病毒治疗。

1.3 检测方法 分别在抗病毒治疗的第 0、7、14、30 天以及第 2、3、6、9、12 个月来本院进行随访。采集外周血 5 mL,离心后-80℃冷冻保存。检测 HBV RNA、HBV DNA、HBsAg、HBeAg 及肝功能指标 ALT、谷草转氨酶(AST)等。(1)北京热景生物科技有限公司定量检测试剂盒进行 HBV RNA 定量检测[荧光定量(TaqMan 探针法)]。(2)采用实时荧光定量 PCR 法(美国 Bio-Rad)进行 HBV DNA 检测。(3)采用化学发光法(美国雅培公司)进行 HBsAg 和 HBeAg 检测。(4)采用全自动生化流水线酶法(德国西门子 advia2400)进行 ALT 及 AST 检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件,计量资料 HBV RNA 和 HBV DNA 是取 log 值的 $\bar{x}\pm s$, HBsAg 采用 log 值的中位数,HBeAg 采用中位数(四分位数)。相邻时间点的变化采用非参数检验的 Wilcoxon 检验。相关性分析采用 Spearman 等级相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

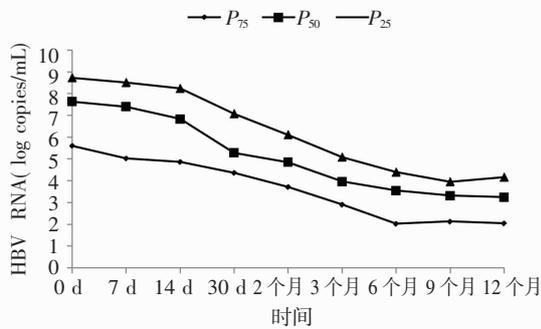
2.1 患者一般资料 HBeAg(+)与 HBeAg(-)患者 HBV RNA、HBV DNA 及 HBsAg 水平差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),见表 1。

3 个月 vs. 6 个月, $P=0.001$)。患者在治疗 6 个月与 9 个月,9 个月与 12 个月两个时间点差异无统计学意义(6 个月 vs. 9 个月, $P=0.006$; 9 个月 vs. 12 个月, $P=0.058$)。

2.3 各时间点患者血清 HBV RNA、HBV DNA、HBsAg、HBeAg 的相关性 基线血清 HBV RNA 与 HBV DNA ($r_s=0.68$)、HbsAg ($r_s=0.64$)、HBeAg ($r_s=0.77$) 均强相关。在治疗前 6 个月的各时间点,HBV RNA 与 HBV DNA 相关性为强相关($r_s>0.50, P<0.05$)。HBV

RNA 与 HBsAg 在治疗前 3 个月相关性为强相关 ($r_s > 0.50$), 治疗 6 个月到 9 个月时为弱相关 ($r_s = 0.23, 0.28$)。HBV RNA 与 HBeAg 水平的相关性在各治疗时间点均为强相关 ($r_s > 0.50$), 见表 2。

HbeAg(-) 患者在治疗 30 d 时血清 HBV RNA 与 HBV DNA 呈正相关 ($P < 0.05$), 在治疗 14 d 时 HBV RNA 与 HBsAg 水平呈正相关 ($P < 0.05$), 见表 3。



注: P₂₅: 25 分位值; P₅₀: 50 分位值; P₇₅: 75 分位值

图 1 各监测时间点患者血清 HBV RNA 水平

Fig 1 Serum HBV RNA levels of patients at each monitoring time point

表 2 HBeAg(+) 患者血清 HBV RNA 与 HBV DNA、HBsAg、HBeAg 的相关性 [$r_s(P)$]

Tab 2 Correlation of serum HBV RNA and HBV DNA, HBsAg, HBeAg in patients with HBeAg(+) [$r_s(P)$]

指标	HBV DNA	HBsAg	HBeAg
HBV RNA 0 d	0.68(<0.001)	0.64(<0.001)	0.77(<0.001)
HBV RNA 7 d	0.71(<0.001)	0.70(<0.001)	0.74(<0.001)
HBV RNA 14 d	0.77(<0.001)	0.79(<0.001)	0.89(<0.001)
HBV RNA 30 d	0.82(<0.001)	0.72(<0.001)	0.85(<0.001)
HBV RNA 2 个月	0.76(<0.001)	0.76(<0.001)	0.92(<0.001)
HBV RNA 3 个月	0.69(<0.001)	0.65(<0.001)	0.79(<0.001)
HBV RNA 6 个月	0.64(<0.001)	0.23(0.31)	0.70(<0.001)
HBV RNA 9 个月	0.432(0.11)	0.28(0.23)	0.81(<0.001)
HBV RNA 12 个月	NA	0.38(0.15)	0.78(<0.001)

注: NA: 不适用

表 3 HbeAg(-) 患者血清 HBV RNA 与 HBV DNA、HBsAg 的相关性 [$r_s(P)$]

Tab 3 Correlation of serum HBV RNA and HBV DNA, HBsAg in patients with HbeAg(-) [$r_s(P)$]

指标	HBV DNA	HbsAg
HBV RNA 0 d	0.43(0.11)	0.48(0.09)
HBV RNA 7 d	0.09(0.78)	0.36(0.15)
HBV RNA 14 d	0.58(0.02)	0.60(0.01)
HBV RNA 30 d	0.62(0.01)	0.39(0.14)
HBV RNA 2 个月	0.08(0.81)	0.42(0.12)
HBV RNA 3 个月	0.40(0.13)	0.07(0.89)
HBV RNA 6 个月	NA	0.29(0.22)
HBV RNA 9 个月	NA	0.18(0.55)
HBV RNA 12 个月	NA	0.13(0.64)

注: NA: 不适用

其他时间点对应的 HBV RNA 与 HBV DNA、HBsAg 水平均无关 (均 $P > 0.05$)。

3 讨论

HBV 共价闭合环状 DNA (HBV cccDNA) 的存在是 HBV 持续感染的标志^[8-9], 但是肝内 HBV cccDNA 定量检测需要进行肝脏的活检, 不适宜作为临床常规的诊断指标。不同于 HBV DNA 和 HBsAg, HBV RNA 是以 HBV cccDNA 为模板进行逆转录, 是 HBV 复制的初始环节^[10-11]。核苷酸类药物是主要抗病毒治疗方法之一, 但核苷酸类药物对 cccDNA 的转录没有直接影响, 即使在检测不到 HBV DNA 时, 由于 cccDNA 可能持续存在, HBV RNA 结果也可能为阳性^[12]。血清 HBV RNA 水平的检测在抗病毒治疗时对于预测治疗反应、指导停药有较高的价值^[13]。研究表明, 血清 HBV RNA 水平与肝脏组织内的 HBV RNA 水平呈强相关性^[14], 其能够反映肝脏组织内的 HBV 转录状态以及炎症损伤和肝脏纤维化程度, 进一步反映肝脏组织学病理状态和病毒转录活性。

有研究表明, HBV DNA 在治疗结束时对低于检测下限的 CHB 患者血清 HBV RNA 进行检测, 血清中 HBV RNA 病毒仍呈阳性的患者在治疗后 24 周均出现病毒反弹, 而在检测不到 HBV RNA 病毒的 CHB 患者中, 只有 1/4 出现病毒反弹。表明 HBV RNA 病毒可能与停止核苷酸类药物治疗后病毒复发的风险有关^[15]。本研究对所有患者在抗病毒治疗各时间点进行血清 HBV RNA 的定量检测, 结果发现, 血清 HBV RNA 水平随着治疗时间的延长呈下降趋势, 从治疗后 2 周到 3 个月, 下降速度最快, 治疗 3 个月后, 下降速度趋缓, 9~12 个月后变化不大, 进入平台期。

HBV RNA 和 HBV DNA 对于反映肝脏组织内的病毒复制转录活动的活跃程度都有重要意义。本研究发现, 大部分患者血清 HBV DNA 在治疗 6 个月时已经低于检测下限, 提示 HBV RNA 水平较血清 HBV DNA 下降速度慢。分析 HbeAg(+) 患者各时间点两者的相关性发现, 在治疗前及治疗后前 9 个月时, 血清 HBV RNA 与血清 HBV DNA 之间均具有相关性 ($r > 0.50, P < 0.05$)。治疗 12 个月时无相关性, 可能是因为抗病毒药使 HBV DNA 水平下降至检测下限, 但对 HBV RNA 没有直接抑制作用所致。

抗病毒治疗前的血清 HBV RNA 水平以及其治疗后 96 周时 HBV RNA 下降的程度与治疗 96 周时血清 HBsAg 水平具有相关性^[16-17]。有研究表明, 抗病毒治疗前, 血清 HBV RNA 水平与 HBeAg 血清学转换率呈线性相关, 并且治疗过程中发生 HBeAg 血清

学转换的患者血清 HBV RNA 水平明显低于未发生血清学转换的患者,由此得出结论,血清 HBV RNA 是病毒学应答和血清 HBeAg 转换率的独立预测因素。本研究发现 HBeAg(+)患者 HBV RNA 与 HBsAg 在治疗后前 3 个月相关性为强相关 ($r>0.50$),治疗 6 个月到 9 个月时为弱相关。HBV RNA 与 HBeAg 水平的相关性在各治疗时间点均为强相关。

HBeAg(-)患者在治疗 30 d 时血清 HBV RNA 与 HBV DNA 呈正相关($P<0.05$),在治疗 14 d 时 HBV RNA 与 HBsAg 水平呈正相关,其他时间点对应的 HBV RNA 与 HBV DNA、HBsAg 水平无关。这可能是因为血清 HBV DNA 与 HBV RNA 之和能够更好地反映 HBeAg 阳性的慢性 HBV 感染者肝组织内 cccDNA 的活性状态^[18]。

综上所述,HBV 抗病毒治疗时,患者血清 HBV RNA 水平随着治疗时间的延长呈下降趋势,随着时间的延长其下降速度趋缓。患者血清 HBV RNA 水平与血清 HBV DNA、HBsAg、HBeAg 在治疗前和治疗初期有明显相关性,随着治疗时间延长,其相关性逐渐减弱。血清 HBV RNA 水平在评估抗病毒治疗、指导停药有一定的临床应用价值。

参考文献:

- [1] 叶永安. 中西医结合治疗慢性乙型肝炎的机遇与挑战[J]. 中西医结合肝病杂志, 2019, 29(3): 197
- [2] 张维璐, 吉兆华, 付婷, 等. 中国 2007—2016 年 59 岁以下普通人群 HBsAg 阳性率的 Meta 分析[J]. 中华流行病学杂志, 2017, 38(9): 1278
- [3] HUANG G, LI P P, LAU W Y, et al. Antiviral therapy reduces hepatocellular carcinoma recurrence in patients with low HBV-DNA levels: a randomized controlled trial[J]. Ann Surg, 2018, 268(6): 943
- [4] MAN-FUNG Y, DING-SHINN C, GEOFFREY M D, et al. Hepatitis B virus infection[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4(4): 18036
- [5] LIU S, ZHOU B, VALDES J D, et al. Serum hepatitis B virus RNA: a new potential biomarker for chronic hepatitis B virus infection[J]. Hepatology, 2019, 69(4): 1816
- [6] MAK L Y, SETO W K, FUNG J, et al. New biomarkers of chronic hepatitis B[J]. Gut Liver, 2019, 13(6): 589
- [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]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(12): 2648.
- [8] ALLWEISS L, DANDRI M. The role of cccDNA in HBV maintenance[J]. Viruses, 2017, 9(6): 156
- [9] ZHU A, LIAO X, LI S, et al. HBV cccDNA and its potential as a therapeutic target[J]. J Clin Transl Hepatol, 2019, 7(3): 258
- [10] HONG X, HU J. Serum HBV RNA composition dynamics as a marker for intrahepatic HBV cccDNA turnover[J]. J Med Virol, 2020, 92(8): 935
- [11] 刘瑞霞, 潘修成, 耿建. 血清 HBV RNA 检测的临床价值[J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(11): 2196
- [12] LIAO H, LIU Y, LI X, et al. Correction: monitoring of serum HBV RNA, HBcrAg, HBsAg and anti-HBc levels in patients during long-term nucleoside/nucleotide analogue therapy[J]. Antivir Ther, 2019, 24(2): 151
- [13] WANG J, YUY, LI G, et al. Natural history of serum HBV-RNA in chronic HBV infection[J]. J Viral Hepat, 2018, 25(9): 1038
- [14] 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[J]. J Hepatol, 2017(17): S0168-8278(17)32261
- [15] WANG J, SHENT, HUANG X B, et al. Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound[J]. J Hepatol, 2016, 65(4): 700
- [16] GAO Y H, LI Y T, MENG Q H, 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]. J Clin Microbiol, 2017, 55(10): 2972
- [17] LU F, WANG J, CHEN X, et al. Potential use of serum HBV RNA in antiviral therapy for chronic hepatitis B in the era of nucleos(t)ide analogs[J]. Front Med, 2017, 11(4): 502
- [18] 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]. J Clin Virol, 2018, 99-100(3): 71

(2021-01-22 收稿)