

## 乙型肝炎病毒核糖核酸的检测及其与抗病毒治疗相关性的研究进展

俞晓琦 张欣欣

HBV 是一种威胁全球人类健康的病毒,也是导致肝硬化及肝细胞癌的主要病因<sup>[1-2]</sup>。据估计,全球约 2.4 亿人为慢性 HBV 感染者,我国约有 9 300 万人<sup>[3]</sup>。HBV 是一种独特的 DNA 病毒,其的复制需要通过前基因组 RNA (pgRNA)来完成<sup>[4]</sup>。目前用于治疗 CHB 的抗病毒药物主要有干扰素和核苷(酸)类似物<sup>[5]</sup>,它们通过直接或间接抑制病毒复制来发挥抗病毒作用。HBV pgRNA 的生成不受核苷(酸)类似物的直接影响,却能被干扰素抑制。本文就 HBV RNA 及其与抗病毒治疗的相关性,包括其可能反映核苷(酸)类似物的抗病毒效能及在抗病毒治疗过程中可能展现出的预测价值等方面的最新研究进展进行综述。

### 一、HBV 的复制周期特点

1. HBV 复制的基本过程:HBV 感染肝细胞,通过相关受体与肝细胞吸附,结合并穿入肝细胞内。其基因组为部分双链环状 DNA 即 rcDNA<sup>[6]</sup>,病毒核心内含 DNA 多聚酶。病毒穿入肝细胞后在细胞质中释放核衣壳,病毒核酸进入细胞核,经 DNA 多聚酶补全双链缺口,形成 cccDNA<sup>[7]</sup>。以此为基础,病毒负链核酸由细胞内的 RNA 聚合酶 II 转录成 3.5 kb 的 RNA,即前基因组 RNA。前基因组 pgRNA 则在细胞质内被包装入核心颗粒<sup>[7]</sup>,经反转录首先合成单链 DNA,随后合成双链 DNA 基因组,形成一个成熟的病毒颗粒<sup>[8]</sup>。成熟的病毒颗粒获得糖蛋白包膜或表面抗原,并向胞外释放。

2. 病毒 RNA 包装与 DNA 合成:HBV pgRNA 被包装入核心颗粒,核心蛋白、反转录酶与 pgRNA 聚集形成一个包含 RNA 的核心<sup>[9]</sup>,病毒的装配随即开始。HBV 病毒颗粒中存在一个位于 pgRNA 5'-末端的包装信号<sup>ε</sup><sup>[4]</sup>,其与 P 蛋白与衣壳蛋白形成独特结构的复合物对前基因组进行包装<sup>[10]</sup>。一旦病毒包装完成,反转录过程随即开始<sup>[11]</sup>。两条 DNA 链的合成是连续的。DNA 负链以 RNA 为模版进行合成,在合成过程中,RNA 模版被酶降解,同时 DNA 正链以新合成的 DNA 负链为模版开始合成。一部分成熟的基因组会返回至细胞核转变为 cccDNA 来保持一定数量的转录模版<sup>[7]</sup>。

### 二、血清 HBV RNA 的可检测性

目前的研究结果显示,血清中存在的 HBV 特异性 RNA 主要为 pgRNA。作为 HBV 复制所必须的中间体,3.5 kb 的 pgRNA 有两项功能,其一是作为 HBV 基因组反转录的模版,其二是作为 mRNA 模版翻译出聚合酶及核心蛋白<sup>[11-12]</sup>。

Rokuhara 等<sup>[13]</sup>在 2006 年进行过一项关于血清中 HBV

RNA 的研究,通过蔗糖密度梯度离心法检测 HBV DNA、HBV RNA 和 HBcAg 的分布情况,进而推断 HBV RNA 组装在病毒样颗粒中的结构,研究还通过检测 HBV DNA、HBV RNA 和 HBcAg 在接受拉米夫定治疗过程中的动态变化,预测其可能是在抗病毒药物治疗过程中与 HBV DNA 意义不同的病毒标志物。近期 Wang 等<sup>[14]</sup>通过一系列的实验发现,血清中检测到的 HBV RNA 绝大部分为前基因组 RNA,且存在于病毒样颗粒中。研究还对细胞培养上清液中的 HBV pgRNA 进行分析,发现其被包装入衣壳蛋白的结构,显示出 HBV 病毒颗粒的核酸组成并不局限于 DNA。Ryu 等<sup>[15]</sup>则针对 HBV pgRNA 衣壳化程度的检测设计出了一种实验方法,通过自制包被了抗-HBc 抗体的 96 孔板捕获样本中衣壳化的 HBV pgRNA 并进行反转录荧光定量 PCR (RT-qPCR)检测,从而实现同时对多个样本进行更快速高效的检测。

### 三、干扰素和核苷(酸)类似物对血清 HBV RNA 的抑制作用

目前使用干扰素和核苷(酸)类似物治疗 CHB 的疗效都不是最理想<sup>[16]</sup>,可能无法获得持续的应答效果并存在潜在的耐药性。干扰素和核苷(酸)类似物可通过免疫调节作用或直接抗病毒作用抑制病毒复制,因此有研究开始关注它们对病毒复制中间体 RNA 的抑制作用,结果均显示血清 HBV RNA 的生成不受核苷(酸)类似物的直接影响,却能被干扰素抑制<sup>[17-18]</sup>。Huang 等<sup>[17]</sup>关于干扰素和拉米夫定对 CHB 患者血清 HBV RNA 抑制效果的研究发现,由于核苷(酸)类似物对 HBV RNA 没有直接抑制作用,接受拉米夫定单药治疗的患者在治疗结束时和随访过程中都能在血清中检测到 HBV RNA,但在接受了序贯的拉米夫定和干扰素联合治疗后,患者血清中未检出 HBV RNA,显示干扰素治疗可以通过抑制 HBV RNA 减少 HBV DNA 复制,从而出现血清 HBV RNA 阴性的检测结果,也在一定程度上解释了接受联合治疗的患者较接受拉米夫定单药治疗的患者有更高的持续应答率。Jansen 等<sup>[18]</sup>也发现接受聚乙二醇干扰素和阿德福韦酯联合治疗的患者比只接受核苷(酸)类似物治疗的患者血清 HBV RNA 水平下降更为显著,且下降的程度和治疗后是否产生应答相关。

### 四、血清 HBV RNA 在 CHB 患者抗病毒治疗中可能的预测作用

对于接受核苷(酸)类似物治疗的 CHB 患者来说,治疗效果最重要的决定因素之一就是治疗过程中药物对病毒抑制的强度,所以寻求一个能够准确提示治疗过程中的病毒学

应答以及预测治疗后疾病复发风险,且便于检测的标志物就显得尤为重要。理论上而言,血清 HBV pgRNA 是与血清 HBsAg 截然不同的检测指标,血清 HBV pgRNA 仅能来自 cccDNA,而 HBsAg 可来自于整合的 HBV DNA 片段<sup>[19]</sup>,因此,很少有患者能在接受抗病毒治疗后达到 HBsAg 转阴的临床治愈指标。血清 HBV pgRNA 与 HBV DNA 的临床意义也不相同,HBV DNA 水平的下降不能反映肝细胞内 cccDNA 的转录活性。而有研究发现,血清 HBV RNA 可以很好地反映肝组织内的 cccDNA 活性<sup>[20-21]</sup>,说明其能够在一定程度上反映病毒的复制状态。有研究发现,HBV RNA 可能在核苷(酸)类似物的抗病毒治疗中起到了多种预测作用,具有重要临床意义<sup>[22]</sup>。

1. 在核苷(酸)类似物治疗期间独立预测病毒学应答:血清 HBV RNA 水平与 HBV DNA 阴转时间相关: Huang 等<sup>[23]</sup>研究了接受核苷(酸)类似物治疗的 CHB 患者血清 HBV RNA 的动态变化,发现在 16 周前出现血清 HBV DNA 阴转的患者较于那些在 16 周后才发生 DAN 阴转的患者,第 12 周的血清 HBV RNA 水平显著降低,而第 12 周较低的血清 HBV RNA 水平也能独立预测更短的血清 HBV DNA 检测结果阴转的时间。该研究显示第 12 周的血清 HBV RNA 水平是预测核苷(酸)类似物治疗后病毒学应答的独立因素,且其预测效果与第 12 周血清 HBV DNA 水平、HBsAg 定量和治疗前血清 ALT 水平无相关性。在接受抗病毒药物治疗的患者中,血清 HBV RNA 被发现还能作为预测 HBeAg 血清学转换的指标。HBeAg 的血清学转换通常作为 CHB 患者停药标志之一。Van Bömmel 等<sup>[24]</sup>研究发现,在接受抗病毒药物治疗后出现血清 HBeAg 阴转的患者中,血清 HBV RNA 水平在治疗后的第 3 个月和第 6 个月都显示出明显的下降;同时,相比于 HBV DNA、HBsAg 等标志物,治疗后第 3 个月和第 6 个月血清 HBV RNA 水平的下降能为 HBeAg 的血清学转换提供更好的预测价值。

2. 预测核苷(酸)类似物停药后的病毒学反弹: Wang 等<sup>[14]</sup>的一项研究随访了 33 例接受核苷(酸)类似物治疗且停药时 HBV DNA 水平低于检测下限的 CHB 患者,其中 21 例患者 HBV RNA 阳性,12 例患者 HBV RNA 水平低于检测下限。在结束治疗后的 24 周,21 例 HBV RNA 阳性的患者都发生了病毒学反弹,而 HBV RNA 阴性的患者中仅有 3 例疾病复发,提示血清 HBV RNA 的水平可能提示核苷(酸)类似物停药后病毒学反弹和疾病复发的风险。Tsuge 等<sup>[25]</sup>也在研究中发现,接受核苷(酸)类似物治疗过程中,第 12 周的血清 HBV DNA 和 RNA 水平可能预测核苷(酸)类似物停药后 HBV 的再激活,包括反映为血清 HBV DNA 的反弹以及在 HBeAg 阳性的 CHB 患者中 ALT 的反弹。该研究中的 36 例患者在核苷(酸)类似物治疗停药后的第 24 周,19 例被观察到出现了 HBV DNA 的反弹,12 例出现了 ALT 的反弹;进一步的统计学分析显示,第 12 周的血清 HBV DNA 和 RNA 水平与 HBV DNA 反弹有显著相关性,在 HBeAg 阳性患者中,与 ALT 的反弹也具有一定相关性。该结果提示联合检测 HBV DNA 和 RNA 水平也许能为预测 HBV 的再激活提供更有效的线索。

3. 在拉米夫定治疗期间预示了早期病毒突变的发生:有研究显示,血清 HBV RNA 在接受拉米夫定治疗的患者中能作为一项预测 YMDD 突变早期发生的指标<sup>[26]</sup>。反转录酶的 YMDD 突变导致耐药病毒的出现是在接受拉米夫定治疗的患者中存在的一项严峻的问题。Hatakeyama 等<sup>[26]</sup>的研究中,1 年内出现 YMDD 突变的患者血清 HBV RNA 的水平要显著高于突变发生在治疗 1 年后或不发生突变的患者,显示血清 HBV RNA 水平能为早期病毒的突变发生提供预测价值。

4. HBV RNA 反映核苷(酸)类似物的抗病毒效能: Huang 等<sup>[23]</sup>对接受核苷(酸)类似物治疗的患者血清 HBV RNA 的动态变化进行了研究分析,结果显示接受恩替卡韦治疗的患者血清 HBV RNA 峰值水平和检出概率都显著高于接受拉米夫定治疗的患者<sup>[17,23]</sup>,提示血清 HBV RNA 水平可能反映了核苷(酸)类似物的抗病毒效能。由于恩替卡韦比拉米夫定能更有效地抑制反转录酶及 HBV DNA 的合成,所以导致血清中的 HBV RNA 水平更高。现阶段的研究结果显示,血清 HBsAg 定量水平对核苷(酸)类似物的治疗结果预测价值不高,此项研究中也得到了类似的结果,在接受恩替卡韦或拉米夫定治疗前后患者的血清 HBsAg 定量值差异无统计学意义。这些结果都提示血清 HBV RNA 水平可能比 HBsAg 定量更好地反映了核苷(酸)类似物的抗病毒效能。

#### 五、总结及展望

核苷(酸)类似物广泛应用于 CHB 的治疗,其可抑制 HBV 复制过程,降低 HBV DNA 水平,但不会直接影响 HBV pgRNA 的形成和病毒蛋白的产生<sup>[18]</sup>,因其不能根除肝细胞内的 cccDNA,所以需要长期治疗以维持抗病毒效果<sup>[27]</sup>。目前,CHB 管理指南或共识建议的停药标准尚不完善,根据现有的预测指标停药后仍有较多复发情况。血清 HBV RNA 可能反映了肝细胞中 cccDNA 的转录活性,因此可将其作为指导核苷(酸)类似物安全停药的指标。

尽管 HBV RNA 已被证实能在 CHB 患者的血清中被检测到,且现阶段的许多研究发现其在抗病毒治疗过程中可能具有以下临床意义:能够反映核苷(酸)类似物的抗病毒效能,独立预测病毒学应答及停药后的病毒学反弹,预示早期病毒突变的发生等<sup>[22]</sup>。但其与抗病毒治疗的相关性依然需要更多的研究来阐明,要将其作为 HBV 感染患者中的监测指标及核苷(酸)类似物安全停药的预测指标也可谓任重道远。相信上述问题的解决将有力地推动及优化 CHB 的治疗策略,改善 CHB 患者的临床转归。

#### 参考文献

- [1] Wong GL, Wong VW, Chan HL. Virus and host testing to manage chronic hepatitis B [J]. Clin Infect Dis, 2016, 62 Suppl 4: S298-305. DOI: 10.1093/cid/ciw024.
- [2] Tong S, Revill P. Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability [J]. J Hepatol, 2016, 64(1 Suppl): S4-16. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.01.027.
- [3] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015 年版)[J]. 中华传染病杂志, 2015, 33(11): 641-662. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6680.2015.11.001.
- [4] Mao R, Nie H, Cai D, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication

- by the host zinc finger antiviral protein[J/OL]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(7): e1003494 (2013-07-11) [2017-05-24]. <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1003494>. DOI:10.1371/journal.ppat.1003494.
- [5] European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection [J]. *J Hepatol*, 2017, 67(2):370-398. DOI:10.1016/j.jhep.2017.03.021.
- [6] Quasdorff M, Protzer U. Control of hepatitis B virus at the level of transcription [J]. *J Viral Hepat*, 2010, 17(8):527-536. DOI:10.1111/j.1365-2893.2010.01315.x.
- [7] Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(11):1118-1129. DOI:10.1056/NEJMra031087.
- [8] Ning X, Nguyen D, Mentzer L, et al. Secretion of genome-free hepatitis B virus--single strand blocking model for virion morphogenesis of para-retrovirus[J/OL]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(9): e1002255 (2011-09-22) [2017-05-24]. <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002255>. DOI:10.1371/journal.ppat.1002255.
- [9] Sheen IS, Tsou YK, Lin SM, et al. Nuclear HBcAg and histology activity index as independent predictors of the expression of singly spliced HBV-RNA [J]. *J Viral Hepat*, 2007, 14(1):70-74. DOI:10.1111/j.1365-2893.2006.00781.x.
- [10] Wang JC, Nickens DG, Lentz TB, et al. Encapsidated hepatitis B virus reverse transcriptase is poised on an ordered RNA lattice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(31):11329-11334. DOI:10.1073/pnas.1321424111.
- [11] Kim DH, Kang HS, Kim KH. Roles of hepatocyte nuclear factors in hepatitis B virus infection [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(31):7017-7029. DOI:10.3748/wjg.v22.i31.7017.
- [12] Yang CC, Huang EY, Li HC, et al. Nuclear export of human hepatitis B virus core protein and pregenomic RNA depends on the cellular NXF1-p15 machinery[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e106683 (2014-10-31) [2017-05-24]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0106683>. DOI:10.1371/journal.pone.0106683.
- [13] Rokuhara A, Matsumoto A, Tanaka E, et al. Hepatitis B virus RNA is measurable in serum and can be a new marker for monitoring lamivudine therapy [J]. *J Gastroenterol*, 2006, 41(8):785-790. DOI:10.1007/s00535-006-1856-4.
- [14] 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]. *J Hepatol*, 2016, 65(4):700-710. DOI:10.1016/j.jhep.2016.05.029.
- [15] Ryu DK, Ahn Y, Ryu WS, et al. Development of a novel hepatitis B virus encapsidation detection assay by viral nucleocapsid-captured quantitative RT-PCR [J]. *Biotechniques*, 2015, 59(5):287-293. DOI:10.2144/000114354.
- [16] Xun Y, Pan Q, Tang Z, et al. Intracellular-delivery of a single-chain antibody against hepatitis B core protein via cell-penetrating peptide inhibits hepatitis B virus replication in vitro [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(2):369-376. DOI:10.3892/ijmm.2012.1210.
- [17] Huang YW, Chayama K, Tsuge M, et al. Differential effects of interferon and lamivudine on serum HBV RNA inhibition in patients with chronic hepatitis B [J]. *Antivir Ther*, 2010, 15(2):177-184. DOI:10.3851/IMP1508.
- [18] Jansen L, Kootstra NA, van Dort KA, et al. 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]. *J Infect Dis*, 2016, 213(2):224-232. DOI:10.1093/infdis/jiv397.
- [19] Larsson SB, Malmström S, Hannoun C, et al. Mechanisms downstream of reverse transcription reduce serum levels of HBV DNA but not of HBsAg in chronic hepatitis B virus infection[J/OL]. *Virology*, 2015, 12:213 (2015-12-09) [2017-05-24]. <http://virology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-015-0447-5>. DOI:10.1186/s12985-015-0447-5.
- [20] Giersch K, Allweiss L, Volz T, et al. Serum HBV pgRNA as a clinical marker for cccDNA activity [J]. *J Hepatol*, 2017, 66(2):460-462. DOI:10.1016/j.jhep.2016.09.028.
- [21] Wang J, Du M, Huang H, et al. Reply to: "Serum HBV pgRNA as a clinical marker for cccDNA activity"; Consistent loss of serum HBV RNA might predict the "para-functional cure" of chronic hepatitis B [J]. *J Hepatol*, 2017, 66(2):462-463. DOI:10.1016/j.jhep.2016.10.034.
- [22] Huang YW, Chayama K, Kao JH, et al. Detectability and clinical significance of serum hepatitis B virus ribonucleic acid [J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2015, 4(3):197-202. DOI:10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.08.
- [23] 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*, 2015, 20(4):369-375. DOI:10.3851/IMP2777.
- [24] 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 [J]. *Hepatology*, 2015, 61(1):66-76. DOI:10.1002/hep.27381.
- [25] Tsuge M, Murakami E, Imamura M, et al. Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleoside analogue treatments in chronic hepatitis B patients [J]. *J Gastroenterol*, 2013, 48(10):1188-1204. DOI:10.1007/s00535-012-0737-2.
- [26] Hatakeyama T, Noguchi C, Hiraga N, et al. Serum HBV RNA is a predictor of early emergence of the YMDD mutant in patients treated with lamivudine [J]. *Hepatology*, 2007, 45(5):1179-1186. DOI:10.1002/hep.21581.
- [27] Shim JJ. Long-term suppression of viral replication in chronic hepatitis B: outcomes and future directions [J]. *Gut Liver*, 2015, 9(3):265-266. DOI:10.5009/gnl15105.

(收稿日期:2017-05-24)

(本文编辑:金昱)