

慢性 HBV 感染者血清 HBV RNA 检测及临床应用的专家共识

刘燕娜¹ 樊蓉² 杨瑞锋³ 刘诗² 王杰¹ 廖昊⁴ 仇超⁵ 邓芮² 黄鸿鑫¹ 胡鹏⁶
郑素军⁷ 张文宏⁵ 陈香梅¹ 陈红松³ 孙剑² 鲁凤民^{3,1} 中华医学会肝病学会
基础医学与实验诊断协作组

¹北京大学基础医学院病原生物学系暨感染病研究中心,北京 100191;²南方医科大学南方医院感染内科广东省病毒性肝炎研究重点实验室广东省肝脏疾病研究所,广州 510515;³北京大学人民医院北京大学肝病研究所,北京 100044;⁴国家感染性疾病临床研究中心南方科技大学第二附属医院(深圳市第三人民医院)检验医学部,深圳 518112;⁵复旦大学附属华山医院感染科,上海 200040;⁶重庆医科大学附属第二医院感染病科重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010;⁷首都医科大学附属北京佑安医院肝病中心,北京 100069

刘燕娜、樊蓉、杨瑞锋对本文有同等贡献

通信作者:鲁凤民:Email: lu.fengmin@hsc.pku.edu.cn;孙剑:Email: doctorsunjian@qq.com;陈红松:Email: chenhongsong@bjmu.edu.cn;陈香梅:Email: xm_chen6176@bjmu.edu.cn

【摘要】 自 1996 年在慢性乙型肝炎患者的外周血中发现游离的乙型肝炎病毒(HBV) RNA 以来,越来越多的研究致力于阐明血清 HBV RNA 的生物学特征和临床应用价值。该共识总结了血清 HBV RNA 存在形式、定量检测方法及目前临床应用的研究进展,并针对定量检测的靶标区域、检测结果和临床应用作出推荐意见,以期更好地将该指标用于临床慢性 HBV 感染者的管理。

【关键词】 慢性乙型肝炎; 乙型肝炎病毒; 脱氧核糖核酸; 检测; 临床应用

Expert consensus on measurement and clinical application of serum HBV RNA in patients with chronic HBV infection

Liu Yanna¹, Fan Rong², Yang Ruifeng³, Liu Shi², Wang Jie¹, Liao Hao⁴, Qiu Chao⁵, Deng Rui², Huang Hongxin¹, Hu Peng⁶, Zheng Sujun⁷, Zhang Wenhong⁵, Chen Xiangmei¹, Chen Hongsong³, Sun Jian², Lu Fengmin^{3,1}; Cooperative Group of Basic Research and Experimental Diagnosis of Liver Diseases, Chinese Society of Hepatology, Chinese Medical Association

¹Department of Microbiology & Infectious Disease Center, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China; ²Guangdong Provincial Institute of Liver Disease, Guangdong Provincial Key Laboratory of Viral Hepatitis Research, Department of Infectious Diseases, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ³Peking University People's Hospital, Peking University Hepatology Institute, Beijing 100044, China; ⁴Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Third People's Hospital, Southern University of Science and Technology, National Clinical Research Center for Infectious Diseases, Shenzhen 518112, China; ⁵Department of Infectious Diseases, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China; ⁶Department of Infectious Diseases, the Second

DOI: 10.3760/cma.j.cn501113-20220420-00214

收稿日期 2022-04-20 本文编辑 朱红梅

引用本文:刘燕娜,樊蓉,杨瑞锋,等.慢性 HBV 感染者血清 HBV RNA 检测及临床应用的专家共识[J].中华肝病杂志,2022,30(5):505-512. DOI: 10.3760/cma.j.cn501113-20220420-00214.



Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Institute for Viral Hepatitis of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; ⁷Liver Diseases Center, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Liu Yanna, Fan Rong and Yang Ruifeng are contributed equal to the article.

Corresponding author: Lu Fengmin, Email: lu.fengmin@hsc.pku.edu.cn

Co-corresponding author: Sun Jian, Email: doctorsunjian@qq.com

Co-corresponding author: Chen Hongsong, Email: chenhongsong@bjmu.edu.cn

Co-corresponding author: Chen Xiangmei, Email: xm_chen6176@bjmu.edu.cn

【Abstract】 Since the discovery of circulating hepatitis B virus (HBV) RNA in the peripheral blood of patients with chronic hepatitis B in 1996, a growing number of studies have focused on clarifying the biological characteristics and clinical application value of serum HBV RNA. This consensus mainly summarizes the research progress of serum HBV RNA existing profiles, quantitative detection methods, and current clinical applications. In order to better apply this indicator for the clinical management of patients with chronic HBV infection, recommendations on quantitative detection target regions, detection results, and clinical applications are put forward.

【Key words】 Chronic hepatitis B; Hepatitis B virus; RNA; Measurement; Clinical application

一、背景

慢性乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染仍然严重威胁国人健康^[1]。现有的抗 HBV 药物核苷(酸)类似物[nucleos(t)ide analogues, NAs]和聚乙二醇干扰素(pegylated-interferon α , PEG-IFN- α)尚不能在短期内治愈慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)。存在于肝组织内的共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA) 是 HBV 复制的源头,与慢性持续性感染和 CHB 难以治愈密切相关。但 cccDNA 的检测需要有创的肝穿活检,无法广泛开展。探索能够反映肝组织内 cccDNA 存在及转录活性的血清替代指标,以客观评价抗病毒疗效及判定合适的停药时机乃当下之亟需。

血清 HBV RNA 是近年发展起来的 HBV 病毒学指标,我国《慢性乙型肝炎防治指南(2019 年版)》^[2]和欧洲肝病学会(European Association for the Study of the Liver, EASL)的《乙型肝炎病毒感染管理临床实践指南(2017 年版)》^[3]均指出,血清 HBV RNA 水平可反映肝组织 cccDNA 转录活性,与患者的病毒学应答及预后相关。2019 年 EASL 和美国肝病学会(American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD)联合发表的 HBV 治疗终点会议报告中,也提出将血清 HBV RNA 作为 cccDNA 存在和转录活性的测定指标^[4]。近期,我国批准了第一款血清 HBV RNA 检测试剂,相信随着更多标准化 HBV RNA 检测试剂的诞生,将会极大地拓展其在临床中的应用。本共识将从血清 HBV RNA 的生物学特征、定量检测方法和临床应用 3 个方面进行阐述,并针对检测和临床应用作出推荐意见,以期更好地将该指标用于临床慢性 HBV 感染者的管理。

二、血清 HBV RNA 的存在形式

1. HBV 前基因组 RNA (pregenomic RNA, pgRNA): 1984 年,Miller 等^[5]首次在 CHB 患者血清中观察到以 HBV DNA-RNA 杂合分子形式存在的 HBV RNA。

1996 年,德国学者 Köck 等^[6]通过 cDNA 末端快速扩增的方法证实了慢性 HBV 感染者的血清中存在多聚腺苷酰 (polyA) 化的 HBV RNA。但直到 20 年后的 2016 年,才有学者证实血液中 HBV RNA 的主要来源为未经逆转录的 HBV pgRNA,存在于有病毒外包膜包裹或裸的核衣壳内^[7-12]。考虑到可能的潜在感染性,国内学者将前者称为“HBV RNA 病毒样颗粒”^[12-14]。此外,伴随着逆转录过程,P 蛋白的 RNase H 活性会将作为模板的 pgRNA 自逆转录起始点逐步降解,并由此产生 3' 末端不同长度缺失的 pgRNA^[15-16]。NAs 在抑制负链 DNA 逆转录合成的同时,会显著增加 3' 端缺失 pgRNA 的释放^[15]。

2. HBV pgRNA 剪接变异体和 3' 端截短型 pgRNA: CHB 患者血清中的 HBV RNA 主要来源于包裹在核衣壳内的 pgRNA,且除了全长 pgRNA 及其逆转录残余外^[9-12],还有不同形式的 pgRNA 剪接变异体和 3' 端截短型等^[10,17-19]。自 1989 年科学家首次在 HBV 感染者的肝脏中鉴定出 pgRNA 剪接变异体以来^[20],已陆续报道 20 种可分泌至细胞外的 pgRNA 剪接变异体(sp1-sp20)^[20-23]。其中最主要的剪接变异体类型是剪接供体位点和受体位点分别位于 2 447 nt 和 489 nt 的 sp1,其含量可以达到 pgRNA 总量的 30%^[21, 24-25]。HBV 基因组有位于 1 919 nt 的经典加尾信号(UAUAAA)和位于 HBx 编码区 1 787 nt 的非经典加尾信号(CAUAAA),分别产生 3.5 kb 全长 pgRNA 和缺失了两个加尾信号之间序列的截短型 pgRNA^[26-27]。近期的研究表明,随着 CHB 患者治疗时间的延长和年龄的增长,截短型 pgRNA 占患者血清总 HBV RNA 的比例会有所升高^[27-28]。

3. HBx 转录本:近年来发现,HBx 转录本也是血清 HBV RNA 组分之一,但含量较低^[19, 29]。其存在形式主要有 3 种,分别为 5' 端始于 HBx 编码区第一个 ATG 上游的编码全长 HBx 蛋白的“典型”转录本,第一个 ATG 之后的编码截短 HBx 蛋白的转录本以及包含了 P 蛋白开放阅读框

的超长 HBx 转录本^[19]。

三、血清 HBV RNA 的定量检测

1. 血清 HBV RNA 定量检测技术:目前用于定量检测血清 HBV RNA 的技术主要为基于 TaqMan 探针法的逆转录-定量聚合酶链反应(quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-qPCR)。考虑到 HBV RNA 水平呈现出从 preC/C、S 到 X 区的逐渐降低^[15, 30-31],建议将血清 HBV RNA 检测的靶区域设计在 pgRNA 5' 端,并尽量位于 sp1 剪接供体位点 2 447 nt 之前。此外,有研究在逆转录的引物上添加一段人工设计的随机“锚定序列”并作为定量引物,以排除 HBV DNA 的干扰^[12, 26]。实时恒温扩增和检测技术(simultaneous amplification and testing, SAT)技术也已被成功用于血清 HBV RNA 的检测,该技术或有助于进一步规避核酸提取产物中混杂的 DNA 对 HBV RNA 定量的干扰^[32]。

推荐意见 1:血清 HBV RNA 检测试剂的靶区域位于 pgRNA 的 5' 端,并位于 2 447 nt(sp1 剪接供体位点)之前。

2. 血清 HBV RNA 定量检测的溯源与标准化:中国食品药品检定研究院已经研制出“乙型肝炎病毒 RNA 检测试剂国家标准品”(批号 340008-201901),其来源于临床 HBV RNA 阳性患者的血浆冻干粉,单位为 U/ml,适用于 HBV RNA 定量检测试剂盒的质量评价。同时,也需使用不同试剂盒平行检测来源于不同临床场景(如不同自然分期、治疗史及病毒基因型等)患者的样本,比较 HBV RNA 定性结果(阴阳性结果)的一致性,比较定量结果的准确度、精密度、抗干扰性、灵敏度、线性范围等关键性能指标,有助于商品化试剂性能的进一步完善。但目前仍缺乏国际公认的标准物质,HBV RNA 定量检测的量值溯源和标准化也是目前迫切需要解决的问题之一。

3. 血清 HBV RNA 定量结果的解读:表 1 总结了血清 HBV RNA 定量检测的不同结果形式,以及对应的解读。

表 1 HBV RNA 定量检测不同结果形式及其对应的解读

HBV RNA (拷贝/ml 或 U/ml)	解读
未检出	无扩增信号,未检出 HBV RNA
最低检测限≤HBV RNA< 线性范围下限	检出 HBV RNA,阳性重现率>95%,但定量值低于线性范围下限,定量值的 CV>20%
线性范围下限≤HBV RNA≤ 线性范围上限	检出 HBV RNA,且位于线性范围内,定量值的精密度可保证, CV<20%
>线性范围上限	HBV RNA 浓度高于线性范围上限,如有必要,需稀释后复测和定量
无效	各种原因引起的结果无效,需重新检测

注:CV:变异系数

四、血清 HBV RNA 的临床意义

1. 血清 HBV RNA 与肝组织内 cccDNA 的相关性:血清 HBV RNA 主要由肝细胞核内的 cccDNA 模板转录而来,故可用于反映 cccDNA 的拷贝数量及其转录活性。研究发现,在未经抗病毒治疗的慢性 HBV 感染患者中,其血清 HBV RNA 定量和肝内 cccDNA 定量存在一定相关性($r=0.250\sim 0.781$)^[33-37],不同研究之间相关系数的差异可能与队列患者临床特征以及血清 HBV RNA 和肝内 cccDNA 检测方法的不同有关。但对 NAs 经治的 CHB 患者,既往研究则显示血清 HBV RNA 定量和肝内 cccDNA 定量之间无明显相关性^[37-38]。然而,恩替卡韦(entecavir, ETV)治疗后患者血清 HBV RNA 水平与肝内 cccDNA 的转录活性(即肝内 HBV RNA 定量与 cccDNA 定量的比值)呈正相关($r=0.584, P=0.001$)^[38],提示 NAs 治疗后血清 HBV RNA 定量可能反映的是肝内 cccDNA 的转录活性而非定量水平。此外,有研究巧妙地以拉米夫定耐药(lamivudine resistance, LAM^R)突变位点(rtM204 I/V)作为区分原有的和新合成 cccDNA 以及血清 HBV RNA 的特征性标志物,发现 LAM^R 患者的血清 HBV RNA 与肝内 cccDNA 的 LAM^R 突变比例高度相关($r=0.96, P=0.000 1$),从“质”的角度阐明 NAs 治疗后血清 HBV RNA 水平与肝内 cccDNA 的相关性^[39]。对于 PEG-IFN- α 治疗的患者,尽管近期一项小样本量研究报道,血清 HBV RNA 定量在治疗前后均与肝内 cccDNA 定量呈中度相关($r=0.781, 0.728, P<0.001$)^[33]。但由于 IFN 对 cccDNA 和 HBV RNA 存在直接或间接的降解作用^[40-43],PEG-IFN- α 治疗下血清 HBV RNA 可否准确反映 cccDNA 的水平及其转录活性仍需进一步明确。综上所述,对于未经抗病毒治疗或经 NAs 治疗的慢性 HBV 感染患者,血清 HBV RNA 有望作为反映肝内 cccDNA 定量或转录活性的标志物。

推荐意见 2:血清 HBV RNA 是反映肝内 cccDNA 数量和遗传组成及其转录活性的无创性标志物,但应注意抗病毒治疗对血清 HBV RNA 与肝内 cccDNA 定量水平相关性的影响。

2. 血清 HBV RNA 与其他病毒学指标的相关性:在未经抗病毒治疗的慢性 HBV 感染者中,血清 HBV RNA 水平与血清 HBV DNA、HBsAg 和 HBV 核心相关抗原(hepatitis B core-related antigen, HBcrAg)定量均呈正相关^[9, 33-35, 44-46],且在 HBeAg 阳性 CHB 患者中更为明显^[9, 33, 44, 45];而在启用 NAs 抗病毒治疗后,患者血清 HBV RNA 与 HBV DNA 和 HBsAg 之间的相关性会逐渐下降甚至消失^[33, 45],但与 HBcrAg 始终保持着较好的相关性^[33, 45-46];此外,对于接受 PEG-IFN- α 治疗的患者,血清 HBV RNA 与 HBV DNA 和 HBcrAg 在治疗前后均具有良好相关性^[33, 45-48],但治疗后与 HBsAg 的相关性明显减弱,甚至失去相关性^[33, 38, 45, 48]。

推荐意见 3:血清 HBV RNA 水平与其他血清病毒学定量检测指标的相关性应考虑抗病毒治疗状态的影响。经

NA 抗病毒治疗后,血清 HBV RNA 与血清 HBV DNA 和 HBsAg 的相关性均下降甚至消失;但其与 HBcAg 在治疗前后皆存在较好的相关性。

3. 血清 HBV RNA 在区分 HBV 感染自然史中的价值:慢性 HBV 感染自然史可分为免疫耐受、免疫清除、免疫控制和再活动 4 期^[2-3]。但因缺少患者的肝脏组织学结果,临床上依据无创性指标对患者的分期会有部分患者被归为“灰色阶段”,仍需无创性指标进行完善。早期曾有研究结果显示血清 HBV RNA 水平在自然病程分期中的分布规律与血清 HBV DNA 水平类似^[34],且可用于预测 CHB 患者的自然史分期^[49]。近期中国香港和北美学者的横断面研究结果均显示,与以往传统的病毒标志物相比,血清 HBV RNA 在区分慢性 HBV 感染者的自然病程方面未凸显出应用优势^[44-45]。未来仍需在大量样本且有肝组织学结果的慢性 HBV 感染人群中进一步探究。

4. 血清 HBV RNA 预测患者治疗应答的价值

(1) 血清 HBV RNA 预测 NAs 治疗应答:越来越多的证据表明,血清 HBV RNA 可用于预测 CHB 患者接受 NAs 治疗的应答情况,包括病毒学应答和 HBeAg 血清学应答^[26, 48, 50-51]。最早来自德国的一项小样本临床研究结果显示,HBV RNA 在治疗前以及治疗 3 个月或 6 个月后的下降水平,相较于血清 HBV DNA 或 HBsAg,可以更好地预测 HBeAg 血清学转换^[26]。但考虑到绝大部分接受一线 NAs 治疗的 CHB 患者可实现病毒学应答,且患者发生 HBeAg 血清学应答与否并不改变治疗方案,因此,目前血清 HBV RNA 在预测 NAs 治疗应答方面的应用前景较为有限。

(2) 血清 HBV RNA 预测 PEG-IFN- α 治疗应答:不同于 NAs 抑制 pgRNA 逆转录的抗病毒机制,PEG-IFN- α 抗病毒治疗机制包括调控宿主免疫、降解或沉默 cccDNA 以及影响 pgRNA 的包装和稳定性等^[40-43],治疗下血清 HBV RNA 的下降也就更为明显^[52]。目前的研究结果显示,血清 HBV RNA 可有效预测 PEG-IFN- α 治疗应答,但与血清 HBV DNA、HBsAg 和 HBeAg 等传统病毒标志物相比,其预测效能并无显著优势^[46, 53-54]。一项纳入了 133 例 HBeAg 阴性 CHB 患者的随机对照研究结果表明,PEG-IFN- α 治疗 12 周与 24 周时的血清 HBV RNA 对于预测治疗应答(定义为 72 周 HBV DNA < 2 000 IU/mL 且 ALT 复常)的受试者操作特征曲线下面积(area under the receiver operating characteristic curves, AUROC)分别为 0.630 和 0.668,进一步与传统的 HBV 标志物联合也未能有效提高早期预测干扰素治疗应答的效能^[55]。在 HBeAg 阳性的患者中,PEG-IFN- α 治疗基线、治疗 12 周和 24 周时的血清 HBV RNA 水平虽也有预测 HBeAg 血清学转换的价值(12 周预测效果最佳, AUROC > 0.75),但与传统的 HBV 标志物相比,未见突出优势^[46, 54]。

在预测 HBsAg 清除方面,一项针对 HBeAg 阴性 CHB 患者的研究发现,PEG-IFN- α 治疗 12 周时血清 HBV RNA 水平更低的患者更容易实现 HBsAg 转阴或 HBsAg 下降^[53]。类似

地,另一项基于 2 个随机对照试验的研究(HBeAg 阳性 176 例, HBeAg 阴性 103 例)表明,在 PEG-IFN- α 治疗 24 周实现 HBV RNA 应答(定义为 HBV RNA 下降 > 2 log₁₀ IU/ml 或下降 > 1 log₁₀ IU/ml 且低于检测下限)的患者,其后期 HBsAg 转阴率显著高于未实现 HBV RNA 应答的患者(10.4% 与 0.8%),且在伴有 HBsAg 下降 > 1 log₁₀ IU/ml 的 HBV RNA 应答者中,HBsAg 的阴转率更高(28.6%)^[56]。但一项纳入了 727 例 HBeAg 阳性患者的大样本研究显示,治疗 12 周 HBV RNA 和 HBsAg 水平在预测 HBsAg 转阴的 AUROC 分别为 0.64 和 0.79,不如 HBsAg 预测其自身转阴的效能^[54]。Lim 等^[57]也报道了类似的研究结果。

推荐意见 4:血清 HBV RNA 可用于预测 CHB 患者接受 NAs 和 PEG-IFN- α 治疗的应答情况。

5. 血清 HBV RNA 指导患者 NAs 停药的价值:尽管各大指南推荐对治疗前 HBeAg 阳性的患者在巩固治疗至少 1~3 年方可考虑停药^[3, 55, 58],但按照该停药标准停用 NAs 1 年内,患者的病毒学复发率和临床复发率仍分别高达 30%~100% 和 6%~76%^[59]。因此,亟需新的无创性标志物用于指导 CHB 患者停药。作为反映肝内 cccDNA 转录活性的无创替代指标,血清 HBV RNA 近年来受到广泛的关注^[60]。早在 2013 年,一项小样本(36 例)研究通过回归分析发现,NAs 治疗后 3 个月时的血清 HBV RNA 及 HBV DNA 载量与停药后病毒反弹显著相关($P=0.043$)^[61]。有学者观察到,HBeAg 阴性感染者经 NAs 治疗后,即使 HBV DNA 被显著抑制,血清 HBV RNA 仍可被检测到^[62]。此后,一项前瞻性停药研究(130 例)的结果显示,血清 HBV RNA 可有效预测 NAs 停药后复发,停药时血清 HBV RNA 阴性的患者停药后 4 年累积病毒学复发率和临床复发率均显著低于 HBV RNA 阳性患者^[63]。与血清 HBV RNA 或 HBV DNA 单阳性的患者相比,HBV RNA/DNA 双阴性的患者,其停药后 4 年的临床复发率更低(8.0% 与 31.4%)^[63]。此外,研究进一步发现,在停药时血清 HBV RNA 阴性且 HBcAg < 4 log₁₀ U/ml 的患者,其停药后 4 年期间临床复发率为 0^[64]。另一项前瞻性研究(114 例)也肯定了血清 HBV RNA 对预测 NAs 停药后病毒学复发的价值^[65]。该研究发现,停药时血清 HBV RNA 高于检测下限(44.6 U/ml)、低于检测下限和检测不到的患者,NAs 停药后 48 周累积病毒学复发率分别为 93.2%、52.1% 和 36.6%($P<0.001$)^[65]。需要注意的是,该研究也显示停药时 HBV RNA 检测不到且 HBsAg < 10 IU/ml 的患者,在停药后 48 周累积病毒学复发率为 9.1%^[65]。

此外,血清 HBV RNA 也被认为可用于预测停药后 HBsAg 转阴情况。一项前瞻性队列研究发现,停药时血清 HBV RNA 阴性合并 HBcAg < 4 log₁₀ U/ml 的患者在停药 14 年后的 HBsAg 清除率显著高于其他患者(16.1% 与 1.3%, $P=0.002$)^[64]。另一项随访时间更长的研究也展现出了类似的结果,停药时血清 HBV RNA < 1 000 拷贝/ml 的患者停药后累计 6 年 HBsAg 清除率显著高于 HBV



RNA ≥ 1 000 拷贝/ml 者(30.9% 与 1.6%, $P=0.007$)^[66]。

综上所述, NAs 停药时已实现血清 HBV RNA 转阴的患者停药后复发风险更低, 但不能完全排除复发的可能性。目前比较明确的是, 对于符合现行停药标准的接受巩固治疗的患者, 若血清 HBV RNA 检测阳性, 应持续进行抗病毒治疗以避免停药带来的疾病复发风险。

推荐意见 5: 对于符合现行停药标准的接受巩固治疗的 CHB 患者, 若血清 HBV RNA 检测阳性, 应持续进行抗病毒治疗以避免停药带来的疾病复发风险。

6. 血清 HBV RNA 预测肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的价值: 首个来自前瞻性抗病毒治疗 CHB 队列(2 974 例)的研究发现, 血清 HBV RNA 水平是 NAs 治疗过程中 HCC 发生的独立危险因素(校正 $HR=2.21, P=0.005$), 提示在 NAs 治疗过程中, 血清 HBV RNA 转阴有利于 CHB 患者的长期预后^[67]。近期的一项病例对照研究结果也显示, NAs 治疗过程中发生 HCC 患者的血清 HBV RNA 水平显著高于非 HCC 患者($P=0.004$)^[68]。未来应进一步探索不同疾病分期和不同疗程下血清 HBV RNA 水平及其动态变化在 HCC 发生、发展中的作用。

7. 血清 HBV RNA 与慢性 HBV 感染患者肝脏组织学的相关性: 一项小样本(47 例)研究发现, 血清 HBV RNA

水平与 CHB 患者肝脏炎症活动度和纤维化分期均相关($r=0.665, 0.722, P$ 值均 <0.001), 以 $2.45 \log_{10}$ 拷贝/ml 作为截断值, 血清 HBV RNA 均可以很好地区分炎症活动度和纤维化评分 <2 和 ≥ 2 的标本(AUROC=0.88, 0.85), 且均优于血清 HBsAg 的诊断效能^[38]。研究进一步通过原位杂交技术观察到肝组织内 HBV RNA 阳性细胞多呈现“簇状”聚集分布且与 HBsAg 在空间位置上较一致, 提示血清 HBV RNA 水平可反映肝内病毒的转录活性, 且与肝组织活动度和其他病毒复制指标相关。

综上所述, 血清 HBV RNA 的定量检测及其临床应用近年来已成为本领域的热点, 国际相关指南或共识也逐渐引用血清 HBV RNA 指标(表 2)。

五、问题与展望

在检测方面, 未来应在血清 HBV RNA 分子生物学表征的基础上开发更加准确可靠的血清 HBV RNA 检测方法。更重要的是, 目前国际并无针对 HBV RNA 定量检测的标准品和标准化方法, 血清 HBV RNA 量值溯源和标准化也是亟待解决的问题之一。

在临床应用方面, 由于依赖肝活检, 肝内 cccDNA 拷贝量和转录活性往往无法准确检测。前期相关研究结果表明血清 HBV RNA 在一定程度上能够反映 CHB 患者肝内

表 2 血清 HBV RNA 检测指标写入国内外肝病相关指南、共识或指导性文件情况汇总

指南/共识	相关描述	发布学会/组织/作者
欧洲肝病学会《乙型肝炎病毒感染管理临床实践指南》(2017 年版)	血清 HBV RNA 在循环中的特征有待进一步研究; 血清 HBV RNA 是研究 cccDNA 转录活性很好的标志物; HBV RNA 定量可能有助于预测 NAs 停药后病毒学反弹; 血清 HBV RNA 在循环中的特征有待进一步研究	欧洲肝病学会 ^[2]
中国《慢性乙型肝炎防治指南(2019 年版)》	HBV RNA 定量: 与肝细胞内 cccDNA 转录活性有关, 在评估 NAs 停药后复发风险方面值得深入研究。目前存在的局限性在于不同研究团队采用的检测方法不完全相同	中华医学会感染病学分会, 中华医学会肝病学分会 ^[2]
2021 年《亚太肝病学会慢性乙型肝炎患者停用核苷(酸)类似物指导意见》	血清 HBV RNA 是反映 HBV 复制的另一种新型生物标志物, 即使在 NAs 治疗后也可检测到	Kao 等 ^[59]
《慢性乙型肝炎病毒感染药物研发指导意见(草案)》	其中一些探索性终点可能包括: 在治疗的各个时间点, 定量 HBsAg 浓度的变化、HBeAg 浓度、HBV RNA、HBcrAg、cccDNA 定量、HBsAg 片段、HBsAg/抗-HBs 免疫复合物	美国食品药品监督管理局
《慢性乙型肝炎临床试验的设计和终点指南暨 2019 年 EASL-AASLD HBV 治疗终点专家会议报告》	停止 NAs 治疗后血清 HBV RNA 水平可预测治疗后的病毒反弹; 必须对血清 HBV RNA 的测定进行标准化验证, 以确保仅测量 HBV RNA(而不是 HBV RNA、DNA 的混合物); 需能够描述所测量的 HBV RNA 类型, 并定义检测结果的临床用途	Cornberg 等 ^[4]
《治愈乙型肝炎的全球性科学战略》	研究消除 HBV 时应优先考虑到发展新的血清学指标(如 HBcrAg 和 HBV RNA), 作为可靠的反映肝内 cccDNA 活性的生物标志物	Revell 等 ^[69]
《专家共识: 慢性乙型肝炎功能性治疗路线图》	血清 HBV RNA 可作为抗病毒治疗中 HBeAg 血清转换率的早期预测因子, 也可作为停药后病毒学反弹和 HBsAg 逆转的潜在预测因子	Ning 等 ^[70]
《乙型肝炎的治疗: 从发现到监管批准》	接受 NAs 治疗的患者血清 HBV DNA 未检测到的情况下, 检测血清中的 HBV RNA 可以预测 cccDNA 转录活性, 并已被证明是停止 NAs 治疗后病毒复发的预测因子; 血清 HBV RNA 水平的检测, 可成为监测 cccDNA 转录活性的一个有利替代指标	Lok 等 ^[71]
《HBV/HCV 相关肝细胞癌抗病毒治疗专家共识》(2021 年更新版)	近期有研究提出 HBV RNA 水平可以作为肝内炎症、纤维化程度的指标, 其可能对 HCC 的发生、发展起作用, 尚需要进一步研究	中华医学会肝病学分会肝癌学组 ^[72]

注: HBV: 乙型肝炎病毒; HCV: 丙型肝炎病毒; cccDNA: 共价闭合环状 DNA; NAs: 核苷(酸)类似物; EASL: 欧洲肝病学会; AASLD: 美国肝病学会; HBsAg: 乙型肝炎病毒表面抗原; HBeAg: 乙型肝炎病毒 e 抗原; HCC: 肝细胞癌

cccDNA 转录活性,但区分慢性 HBV 感染自然病程的作用仍有待进一步在大样本、不同人群的队列中研究。在预测抗病毒应答方面,由于 NAs 治疗中 HBeAg 血清学转换的临床重要性受到挑战,因此,血清 HBV RNA 在预测 NAs 治疗中 HBeAg 血清学应答的应用场景有限。尽管如此,血清 HBV RNA 在预测 NAs 停药后复发方面有着不错的表现,停药时实现血清 HBV RNA 转阴的患者停药后复发风险更低,可在临床上协助筛选真正可停药的患者,但该指标对停药后持续应答的预测价值仍有待研究。前期研究还提示血清 HBV RNA 可用于预测 CHB 患者的 HCC 发生风险,提示血清 HBV RNA 转阴有利于 CHB 患者的长期预后,未来也期待有大样本、长期随访的 CHB 抗病毒队列研究进一步阐明。随着抗 HBV 新药尤其是靶向衣壳组装兼具 cccDNA 合成抑制功能的核心蛋白变构调节剂类药物的研发和未来可能的成功上市,血清 HBV RNA 的临床意义将不断被挖掘和明确。

最后,在卫生经济学方面,未来应明确应用该指标的临床场景,在充分发挥其诊断和疗效评估价值的同时,最大限度降低患者和社会的经济负担。

咨询指导专家 (按姓氏首字母拼音顺序):蔡大川、陈成伟、陈娟、陈军、陈瑜、成军、戴二黑、党双锁、邓强、窦晓光、封波、冯亦农、高志良、Ju-Tao Guo、侯金林、胡波、胡国信、黄爱龙、贾继东、江建宁、李伯安、林炳亮、刘妍、娄金丽、鲁晓攀、宓余强、毛青、牛俊奇、欧启水、彭劫、彭亮、任红、任万华、沈毅、苏瑞、唐红、王福生、王磊、王雅杰、韦嘉、谢青、徐东平、徐小元、袁正宏、叶永安、尤红、于乐成、张大志、张继明、张缙云、张欣欣、赵鸿、赵景民;中华医学会肝病学会基础医学与实验诊断协作组成员

利益冲突 北京大学、南方医科大学南方医院各持有 1 项 HBV RNA 相关有效专利

作者贡献声明 刘燕娜、樊蓉、杨瑞锋、刘诗、王杰、廖昊、仇超、邓芮、黄鸿鑫:资料分析与整理,文稿起草;陈香梅:共识设计,起草文稿,对文中关键性理论做出修改;郑素军、胡鹏、张文宏、陈红松、孙剑、鲁凤民:共识设计,对文中关键性理论做出修改;中华医学会肝病学会基础医学与实验诊断协作组:学术支持

参 考 文 献

- Wang F, Fan J, Zhang Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. *Hepatology*, 2014, 60(6):2099-2108. DOI: 10.1002/hep.27406.
- 中华医学会感染病学分会, 中华医学会肝病学会. 慢性乙型肝炎防治指南(2019年版)[J]. *中华肝病杂志*, 2019, 12(27):938-939. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2019.12.007.
- 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.
- Cornberg M, Lok AS, Terrault NA, et al. Guidance for design and endpoints of clinical trials in chronic hepatitis B-report from the 2019 EASL-AASLD HBV treatment endpoints conference(double dagger) [J]. *J Hepatol*, 2020, 72(3): 539-557. DOI: 10.1016/j.jhep.2019.11.003.
- Miller RH, Tran CT, Robinson WS. Hepatitis B virus particles of plasma and liver contain viral DNA-RNA hybrid molecules[J]. *Virology*, 1984, 139(1): 53-63. DOI: 10.1016/0042-6822(84)90329-5.
- Köck J, Theilmann L, Galle P, et al. Hepatitis B virus nucleic acids associated with human peripheral blood mononuclear cells do not originate from replicating virus[J]. *Hepatology*, 1996, 23(3):405-413. DOI: 10.1002/hep.510230303.
- Shen S, Xie Z, Cai D, et al. Biogenesis and molecular characteristics of serum hepatitis B virus RNA[J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16(10):e1008945. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008945.
- Bai L, Zhang X, Kozlowski M, et al. Extracellular hepatitis B virus RNAs are heterogeneous in length and circulate as capsid-antibody complexes in addition to virions in chronic hepatitis B patients[J]. *J Virol*, 2018, 92(24): e00798-18. DOI: 10.1128/JVI.00798-18.
- Prakash K, Rydell G E, Larsson S B, et al. High serum levels of pregenomic RNA reflect frequently failing reverse transcription in hepatitis B virus particles[J]. *J Virol*, 2018, 15(1): 86. DOI: 10.1186/s12985-018-0994-7.
- Lam AM, Ren S, Espiritu C, et al. Hepatitis B virus capsid assembly modulators, but not nucleoside analogs, inhibit the production of extracellular pregenomic RNA and spliced RNA variants[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(8): e00680-17. DOI: 10.1128/AAC.00680-17.
- 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.
- 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.
- 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): 502-508. DOI: 10.1007/s11684-017-0590-z.
- 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]. *中华肝病杂志*, 2017, 25(2):105-110. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2017.02.005.
- Liu Y, Liu H, Hu Z, et al. Hepatitis B virus virions produced under nucleos(t)ide analogue treatment are mainly not infectious because of irreversible DNA Chain termination[J]. *Hepatology*, 2020, 71(2): 463-476. DOI: 10.1002/hep.30844.
- Zhang P, Liu F, Guo F, et al. Characterization of novel hepadnaviral RNA species accumulated in hepatoma cells treated with viral DNA polymerase inhibitors[J]. *Antiviral Res*, 2016, 131: 40-48. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.04.007.
- Wang J, Sheng Q, Ding Y, et al. HBV RNA virion-like particles produced under nucleos(t)ide analogues treatment are mainly replication-deficient[J]. *J Hepatol*, 2018, 68(4): 847-849. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.10.030.
- Shen S, Xie Z, Cai D, et al. Biogenesis and molecular characteristics of serum hepatitis B virus RNA[J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16(10):e1008945. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008945.
- Stadelmayer B, Diederichs A, Chapus F, et al. Full-length 5'RACE identifies all major HBV transcripts in HBV-infected



- hepatocytes and patient serum[J]. *J Hepatol*, 2020, 73(1): 40-51. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.01.028.
- [20] Su TS, Lui WY, Lin LH, et al. Analysis of hepatitis B virus transcripts in infected human livers[J]. *Hepatology*, 1989, 9(2): 180-185. DOI: 10.1002/hep.1840090203.
- [21] Lim CS, Sozzi V, Littlejohn M, et al. Quantitative analysis of the splice variants expressed by the major hepatitis B virus genotypes[J]. *Microb Genom*, 2021, 7(1): mgen000492. DOI: 10.1099/mgen.0.000492.
- [22] Ma Z, Lin X, Wang Y, et al. A double-spliced defective hepatitis B virus genome derived from hepatocellular carcinoma tissue enhanced replication of full-length virus[J]. *J Med Virol*, 2009, 81(2):230-237. DOI: 10.1002/jmv.21393.
- [23] Chen PJ, Chen CR, Sung JL, et al. Identification of a doubly spliced viral transcript joining the separated domains for putative protease and reverse transcriptase of hepatitis B virus[J]. *J Virol*, 1989, 63(10):4165-4171. DOI: 10.1128/JVI.63.10.4165-4171.1989.
- [24] Chen J, Wu M, Wang F, et al. Hepatitis B virus spliced variants are associated with an impaired response to interferon therapy[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16459. DOI: 10.1038/srep16459.
- [25] Rosmorduc O, Petit MA, Pol S, et al. In vivo and in vitro expression of defective hepatitis B virus particles generated by spliced hepatitis B virus RNA[J]. *Hepatology*, 1995, 22(1):10-19.
- [26] van Bommel 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.
- [27] Su Q, Breitkreutz R, Schröder CH, et al. Circulating hepatitis B virus nucleic acids in chronic infection: Representation of differently polyadenylated viral transcripts during progression to nonreplicative stages[J]. *Clin Cancer Res*, 2001,7(7): 2005-2015.
- [28] Kairat A, Beerheide W, Zhou G, et al. Truncated hepatitis B virus RNA in human hepatocellular carcinoma: its representation in patients with advancing Age[J]. *Intervirology*, 1999, 42(4): 228-237. DOI: 10.1159/000024982.
- [29] Niu C, Livingston CM, Li L, et al. The Smc5/6 complex restricts HBV when localized to ND10 without inducing an innate immune response and is counteracted by the HBV X protein shortly after infection[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e169648. DOI: 10.1371/journal.pone.0169648.
- [30] Yu G, Chen R, Zheng S, et al. A standardized assay for the quantitative detection of serum HBV RNA in chronic hepatitis B patients[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2022, 11(1): 775-785. DOI: 10.1080/22221751.2022.2045874.
- [31] Liu S, Wu Y, Deng R, et al. Methodology-dependent performance of serum HBV RNA in predicting treatment outcomes in chronic hepatitis B patients[J]. *Antiviral Res*, 2021, 189:105037. DOI: 10.1016/j.antiviral.2021.105037.
- [32] 张缈曲, 张琪然, 张寒悦, 等. 一种新型乙型肝炎病毒 RNA 定量检测方法的临床检测性能评估[J]. *中华传染病杂志*, 2020, 38(12):782-785. DOI: 10.3760/cma.j.cn311365-20191225-00427.
- [33] Wang X, Chi X, Wu R, et al. Serum HBV RNA correlated with intrahepatic cccDNA more strongly than other HBV markers during peg-interferon treatment[J]. *Virol J*, 2021, 18(1): 4. DOI: 10.1186/s12985-020-01471-2.
- [34] Wang J, Yu Y, Li G, et al. Natural history of serum HBV-RNA in chronic HBV infection[J]. *J Viral Hepat*, 2018, 25(9): 1038-1047. DOI: 10.1111/jvh.12908.
- [35] Huang H, Wang J, Li W, et al. Serum HBV DNA plus RNA shows superiority in reflecting the activity of intrahepatic cccDNA in treatment-naive HBV-infected individuals[J]. *J Clin Virol*, 2018, 99-100: 71-78. DOI: 10.1016/j.jcv.2017.12.016.
- [36] 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.
- [37] Gao Y, Li Y, Meng 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]. *J Clin Microbiol*, 2017, 55(10): 2972-2982. DOI: 10.1128/JCM.00760-17.
- [38] 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*, 2018, 68(1):16-24. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.08.021.
- [39] Huang Q, Zhou B, Cai D, et al. Rapid turnover of hepatitis B virus covalently closed circular DNA indicated by monitoring emergence and reversion of signature - mutation in treated chronic hepatitis B patients[J]. *Hepatology*, 2021,73(1):41-52. DOI: 10.1002/hep.31240.
- [40] Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, et al. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA[J]. *Science*, 2014, 343(6176):1221-1228. DOI: 10.1126/science.1243462.
- [41] Liu Y, Nie H, Mao R, et al. Interferon-inducible ribonuclease ISG20 inhibits hepatitis B virus replication through directly binding to the epsilon stem-loop structure of viral RNA[J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13(4): e1006296. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006296.
- [42] Belloni L, Allweiss L, Guerrieri F, et al. IFN-alpha inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(2):529-537. DOI: 10.1172/JCI58847.
- [43] Wieland SF, Eustaquio A, Whitten-Bauer C, et al. Interferon prevents formation of replication-competent hepatitis B virus RNA-containing nucleocapsids[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(28): 9913-9917. DOI: 10.1073/pnas.0504273102.
- [44] Ghany MG, King WC, Lisker-Melman M, et al. Comparison of HBV RNA and hepatitis B core related antigen with conventional HBV markers among untreated adults with chronic hepatitis B in north America[J]. *Hepatology*, 2021, 74(5):2395-2409. DOI: 10.1002/hep.32018.
- [45] Mak LY, Cloherty G, Wong DK, et al. HBV RNA profiles in patients with chronic hepatitis B under different disease phases and antiviral therapy[J]. *Hepatology*, 2021, 73(6): 2167-2179. DOI: 10.1002/hep.31616.
- [46] 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.
- [47] 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[J]. *Hepatology*, 2018, 68(6): 2106-2117. DOI: 10.1002/hep.30082.
- [48] 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.
- [49] Liu Y, Jiang M, Xue J, et al. Serum HBV RNA quantification: useful for monitoring natural history of chronic hepatitis B infection[J]. *BMC Gastroenterol*, 2019, 19(1):53. DOI: 10.1186/s12876-019-0966-4.
- [50] 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[J]. *Int J Infect Dis*, 2020, 99: 171-178. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.07.031.
- [51] Wang Y, Liao H, Deng Z, et al. Serum HBV RNA predicts HBeAg clearance and seroconversion in patients with chronic hepatitis B treated with nucleos(t)ide analogues[J]. *J Viral Hepat*, 2022. Epub ahead of print. DOI: 10.1111/jvh.13671.
- [52] 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]. *J Clin Microbiol*, 2020, 58(9): e00075-20. DOI: 10.1128/JCM.00075-20.
- [53] Farag MS, van Campenhout M, Pfefferkorn M, et al. Hepatitis B virus RNA as early predictor for response to pegylated interferon alpha in HBeAg-negative chronic hepatitis B[J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 72(2): 202-211. DOI: 10.1093/cid/ciaa013.
- [54] 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[J]. *Hepatol Int*, 2020, 14(2): 212-224. DOI: 10.1007/s12072-020-10015-3.
- [55] Sarin SK, Kumar M, Lau GK, et al. Asian-pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update[J]. *Hepatol Int*, 2016, 10(1): 1-98. DOI: 10.1007/s12072-015-9675-4.
- [56] Brakenhoff SM, Man RA, Boonstra A, et al. Hepatitis B virus RNA decline without concomitant viral antigen decrease is associated with a low probability of sustained response and hepatitis B surface antigen loss[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2021, 53(2): 314-320. DOI: 10.1111/apt.16172.
- [57] Lim SG, Phyo WW, Ling J, et al. Comparative biomarkers for HBsAg loss with antiviral therapy shows dominant influence of quantitative HBsAg (qHBsAg)[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2021, 53(1): 172-182. DOI: 10.1111/apt.16149.
- [58] Terrault N, Lok A, McMahon B, et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance[J]. *Hepatology*, 2018, 67(4): 1560-1599. DOI: 10.1002/hep.29800.
- [59] Kao J, Jeng W, Ning Q, et al. APASL guidance on stopping nucleos(t)ide analogues in chronic hepatitis B patients[J]. *Hepatol Int*, 2021, 15(4):833-851. DOI: 10.1007/s12072-021-10223-5.
- [60] Liu S, Zhou B, Valdes JD, et al. Serum hepatitis B virus RNA: a new potential biomarker for chronic hepatitis B virus infection[J]. *Hepatology*, 2019, 69(4): 1816-1827. DOI: 10.1002/hep.30325.
- [61] Tsuge M, Murakami E, Imamura M, et al. Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleotide analogue treatments in chronic hepatitis B patients[J]. *J Gastroenterol*, 2013, 48(10): 1188-1204. DOI: 10.1007/s00535-012-0737-2.
- [62] Carey I, Gersch J, Wang B, et al. Pregenomic HBV RNA and hepatitis B core-related antigen predict outcomes in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients suppressed on nucleos(t)ide analogue therapy[J]. *Hepatology*, 2020, 72(1):42-57. DOI: 10.1002/hep.31026.
- [63] 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[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2019, 18(3): 719-727. DOI: 10.1016/j.cgh.2019.07.046.
- [64] 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]. *J Infect Dis*, 2020, 222(4): 611-618. DOI: 10.1093/infdis/jiaa136.
- [65] Seto WK, Liu KS, Mak LY, et al. Role of serum HBV RNA and hepatitis B surface antigen levels in identifying Asian patients with chronic hepatitis B suitable for entecavir cessation[J]. *Gut*, 2021, 70(4): 775-783. DOI: 10.1136/gutjnl-2020-321116.
- [66] Xia M, Chi H, Wu Y, et al. Serum hepatitis B virus RNA level is associated with biochemical relapse in patients with chronic hepatitis B infection who discontinue nucleos(t)ide analogue treatment[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2021, 54(5): 709-714. DOI: 10.1111/apt.16538.
- [67] Liu S, Deng R, Zhou B, et al. Association of serum hepatitis B virus RNA with hepatocellular carcinoma risk in chronic hepatitis B patients under nucleos(t)ide analogues therapy[J]. *J Infect Dis*, 2021. DOI: 10.1093/infdis/jiab597. Online ahead of print.
- [68] Mak LY, Huang Q, Wong DK, et al. Residual HBV DNA and pgRNA viraemia is associated with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B patients on antiviral therapy[J]. *J Gastroenterol*, 2021, 56(5):479-488. DOI: 10.1007/s00535-021-01780-5.
- [69] Revill PA, Chisari FV, Block JM, et al. A global scientific strategy to cure hepatitis B[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2019, 4(7): 545-558. DOI: 10.1016/S2468-1253(19)30119-0.
- [70] Ning Q, Wu D, Wang GQ, et al. Roadmap to functional cure of chronic hepatitis B: an expert consensus[J]. *J Viral Hepat*, 2019, 26(10): 1146-1155. DOI: 10.1111/jvh.13126.
- [71] Lok AS, Zoulim F, Dusheiko G, et al. Hepatitis B cure: from discovery to regulatory approval[J]. *J Hepatol*, 2017, 67(4): 847-861. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.05.008.
- [72] 中华医学会肝病学会肝病学组. HBV/HCV 相关肝细胞癌抗病毒治疗专家共识(2021 年更新版)[J]. *中华肝病杂志*, 2021, 29(10):948-966. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2021.10.008.

