

# 慢性乙型肝炎不同自然病程 HBV RNA 的动态变化 及与 HBsAg、HBV DNA 的相关性研究

张晓晶, 武瑞, 黄伟, 刘雁, 吴晓璞, 刘寿荣

杭州市西溪医院(杭州市第六人民医院)肝病科, 浙江 杭州 310023

**摘要:** **目的** 本研究旨在探索乙型肝炎不同自然病程中血清 HBV RNA 的动态变化, 及其与血清 HBV DNA、HBsAg 等指标的相关性。**方法** 本研究共纳入 2021 年 1 月—8 月在杭州市西溪医院门诊及住院部就诊的, 从未给予抗病毒治疗的慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者 124 例, 包括免疫耐受期(immune tolerance period, IT)组 21 例、免疫清除期(immune clearance period, IC)组 48 例、低复制期(low copy period, LC)组 33 例、再活动期(reactive hepatitis, RH)组 22 例。将慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者不同自然病程的测定结果进行统计分析。**结果** 在乙型肝炎 4 个不同自然病程(IT、IC、LC、RH)中, 血清 HBV RNA 阳性率分别为 100.00%、100.00%、69.70%、95.45%。在 HBV DNA < 500 IU/ml 标本中, HBV RNA 检出率为 66.20%。血清 HBV RNA 定量在免疫耐受期、免疫清除期、再活动期、低复制期患者中依次降低, 但 HBV RNA 定量在免疫耐受期与免疫清除期表达不存在显著差异, 其余阶段两两比较, 差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。血清 HBV RNA 与 HBsAg、HBV DNA 成正相关( $r$  值分别为 0.789、0.921,  $P < 0.001$ )。**结论** 在乙型肝炎未治患者中血清 HBV RNA 与血清 HBsAg、HBV DNA 具有正相关关系, 且随着慢性 HBV 感染病程的进展, 血清 HBV RNA 水平逐渐下降。

**关键词:** 乙型肝炎病毒; HBV RNA 定量; HBV DNA 定量; HBsAg 定量

中图分类号: R512.6+2 文献标识码: A 文章编号: 1004-8685(2022)15-1832-04

## Study on dynamic changes of HBV RNA and its correlation with HBsAg and HBV DNA in different natural course of hepatitis B

ZHANG Xiao-jing, WU Rui, HUANG Wei, LIU Yan, WU Xiao-ying, LIU Shou-rong

Department of Liver Disease, Hangzhou Xixi Hospital, Sixth People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou, Zhejiang 310023, China

**Abstract: Objective** The purpose of this study is to explore the dynamic changes of serum HBV RNA in different natural course of hepatitis B and its correlation with serum HBV DNA, HBsAg and other indicators. **Methods** A total of 124 patients with chronic hepatitis B (CHB) who had never received antiviral therapy were enrolled in the study from January 2021 to August 2021 in the outpatient and inpatient departments of Xixi Hospital in Hangzhou, including 21 patients in immune tolerance period (IT) group, 48 patients in immune clearance period (IC) group, 33 patients in low copy period (LC) group and 22 patients in reactive hepatitis (RH) group. The results of different natural course of chronic hepatitis B virus (HBV) infection were analyzed statistically. **Results** The positive rate of serum HBV RNA was 100.00%, 100.00%, 69.70% and 95.45% in four different natural course of hepatitis B (IT, IC, LC and RH), respectively. In the specimens of HBV DNA < 500 IU/ml, the detection rate of HBV RNA was 66.20%. Serum HBV RNA quantification decreased in the immune tolerance stage, the immune clearance stage, the reactivity stage and the low replication stage, but there was no significant difference in the expression of HBV RNA quantification in the immune tolerance stage and the immune clearance stage. There was statistical significance on the differences in the other stages of pair comparison ( $P < 0.001$ ). Serum HBV RNA was positively correlated with HBsAg and HBV DNA, with correlation coefficients ( $r$ ) of 0.789 and 0.921, respectively ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** Serum HBV RNA

**基金项目:** 国家“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项“十三五”计划(2017ZX10302201); 杭州市科技计划引导项目(20201231Y040); 杭州市科技计划引导项目(20191203B116)

**作者简介:** 张晓晶(1989-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事肝病、感染等方面的工作。

**通信作者:** 刘寿荣, E-mail: lsr85463990@126.com

was significantly correlated with serum HBsAg and HBV DNA in untreated patients, and the serum HBV RNA level decreased gradually with the progression of chronic HBV infection.

**Key Words:** Hepatitis B virus; HBV RNA quantification; HBV DNA quantification; HBsAg quantification

乙型肝炎病毒(HBV)在全球范围内流行,据估计我国一般例群 HBsAg 流行率为 5% ~ 6%,慢性 HBV 感染者大约 7 000 万例,其中慢性乙型病毒性肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者有 2 000 万例 ~ 3 000 万例<sup>[1]</sup>。HBV 侵入肝细胞后,形成共价闭合环状 DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)是病毒复制的开始和持续 HBV 感染的关键因素<sup>[2]</sup>。因此检测 cccDNA 具有重要的临床意义,是评价 HBV 复制活跃程度和抗病毒疗效的重要指标。但 cccDNA 的检测需要肝组织标本,临床应用受到一定限制。所以目前亟需一种替代性的、能够真实反映肝组织内 cccDNA 活性的病毒学指标。早在 1996 年, Köck 等<sup>[3]</sup>已经在慢性 HBV 感染者的血清中检测到了 HBV RNA,血清 HBV RNA 为 3.5 kb 的前基因组 RNA (pregenomic RNA, pgRNA),以感染肝细胞内的 cccDNA 为模板反转录产生,能反应肝组织 cccDNA 活性,亦与 HBV 复制、感染状态、预测病毒学应答和血清学转换等密切相关<sup>[4]</sup>。慢性 HBV 感染的自然史通常分为四种状态:免疫耐受期、免疫清除期、低复制期和再活动期<sup>[5-6]</sup>。本研究拟通过观察血清 HBV RNA、HBV DNA、HBsAg 在乙型肝炎病毒感染的四个自然史中的动态变化及其相关性,来探寻血清 HBV RNA 对指导 CHB 患者的管理。

## 1 资料与方法

**1.1 资料** 本研究纳入 2021 年 1 月—8 月在杭州市西溪医院肝病科门诊及住院部的慢性 HBV 感染者 124 例,本研究项目已经获得医院伦理委员会的批准。本研究包括免疫耐受期(IT)患者 21 例,其中男性 11 例,女性 10 例;免疫清除期(IC)患者 48 例,其中男性 27 例,女性 21 例;低复制期慢性乙型肝炎(LC)患者 33 例,其中男性 21 例,女性 12 例;再活动期肝炎(RH)患者 22 例,其中男性 14 例,女性 8 例。诊断符合 2019 年中华医学会肝病学会制定的《慢性乙型肝炎防治指南》<sup>[7]</sup>,所有的患者均未经过抗病毒治疗。排除标准:(1)妊娠期、哺乳期女性;(2)酗酒者,合并其他肝脏方面疾病的患者(如甲型、丙型、丁型、戊型病毒性肝炎,艾滋病病毒性肝炎、药物性肝炎、自身免疫性肝病等);(3)合并有严重的器质性疾病,包括未被控制的原发性心脏、肺脏、肾脏、血管性、消化性、神经性、代谢性疾病(如甲亢,不能控制的糖尿病、肾上

腺的疾病,以及精神分裂症等);(4)近 6 个月正在接受皮质醇类固醇药物、免疫抑制剂者;(5)研究者认为存在不适宜入组的其他情况。

### 1.2 方法

**1.2.1 血清 HBV RNA 的检测** 本研究血清 HBV RNA 的检测使用乙型肝炎病毒核酸测定的试剂盒(中国上海仁度生物科技股份有限公司),使用 RNA 捕获探针法,本检测分为核酸捕获以及实时荧光核酸恒温扩增检测。核酸捕获主要是通过病毒核酸提取液中的磁性颗粒特异性捕获靶标 RNA,实时荧光核酸恒温扩增检测(simultaneous amplification and testing, SAT)是一种 RNA 转录扩增的同时使用探针实时检测的方法。HBV RNA < 50 copies/ml 为阴性。

**1.2.2 血清 HBV DNA 的检测** 血清样本经裂解液裂解细胞后,通过磁珠与 DNA 分子特异性地识别及高效结合,然后利用磁性分离器使磁珠吸附于管壁,通过洗涤、洗脱以及纯化后得到高纯度的 DNA,然后采用乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒,在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪上行 HBV DNA 检测;HBV DNA < 30 IU/ml 为阴性。

**1.2.3 血清乙肝三系的检测** 应用化学发光免疫分析法在美国雅培 Alinity i 全自动化学发光免疫分析仪上行乙肝血清标记物的检测,HBsAg 定量 < 0.05 IU/ml 判断为阴性,对于 HBsAg 检测值 > 250 IU/ml 的样本,采用 1 : 50 标准液稀释,混匀后上机检测;HBeAg < 1 S/CO 为阴性。

**1.2.4 肝功能的检测** 采用 Beckman Coulter AU5831 的全自动生化分析仪检测谷丙转氨酶(Alanine aminotransferase, ALT),谷草转氨酶(Aspartate aminotransferase, AST);ALT 正常值为 9 U/L ~ 50 U/L,AST 正常值为 15 U/L ~ 40 U/L。

**1.3 统计学处理** 使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,先分析变量资料是否为正态分布,符合正态分布的计量资料用平均数 ± 标准差来进行描述,组间比较是采用 Kruskal - Wallis 检验。血清 HBV DNA、HBV RNA、HBsAg、HBeAg 水平进行 log<sub>10</sub> 转换。而分类资料采用计数或构成比来进行描述。变量资料 2 组间的比较使用  $\chi^2$  检验,连续性定量资料 2 组间的比较,如数据满足正态分布且方差齐时采用 *t* 检验,数据不满足正态分布时采用的是秩和检验。两变量间相关性分析在符合正态分布的线性关系时采用 Pearson 相

关性分析,否则使用 Spearman 相关性分析。2 组间指标的表达式采用 Mann - Whitney  $U$  检验。检验水准是双侧检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 基本资料及各项指标的检测结果** 本研究共纳入 124 例 HBV 感染者,包括免疫耐受期(IT)患者

21 例,年龄为 26 岁 ~ 37 岁;免疫清除期(IC)患者 48 例,年龄为 30 岁 ~ 39 岁;低复制期慢性乙型肝炎(LC)患者 33 例,年龄为 37 岁 ~ 53 岁;再活动期肝炎(RH)患者 22 例,年龄为 39 岁 ~ 57 岁。HBV 感染者不同自然病程患者的性别、年龄、HBsAg 水平、HBeAg 水平、HBV RNA 水平、HBV DNA 水平、ALT 水平、AST 水平等基本信息详见表 1。

表 1 124 例 HBV 感染者不同自然病程的各项指标检测结果

分组	年龄(岁)	性别(男/女,例)	HBsAg( $\log_{10}$ IU/ml)	HBeAg(S/CO)
IT( $n=21$ )	32(26,37)	11/10	4.56(4.42,4.70)	1 253.29(1 142.24,1 474.07)
IC( $n=48$ )	32(30,39)	27/21	4.03(3.55,4.39)	569(76.43,1 126.35)
LC( $n=33$ )	49(37,53)	21/12	2.17(1.44,3.05)	0.41(0.39,0.43)
RH( $n=22$ )	48(39,57)	14/8	3.00(2.48,3.32)	0.42(0.37,0.45)
$P$ 值	<0.001	0.797	<0.001	<0.001

续表

分组	HBV RNA( $\log_{10}$ IU/ml)	HBV DNA( $\log_{10}$ IU/ml)	ALT(U/L)	ASL(U/L)
IT( $n=21$ )	7.25(6.42,7.54)	7.88(7.64,8.15)	32(27,54)	31(25,38)
IC( $n=48$ )	6.88(5.73,7.64)	7.33(6.78,8.07)	215(95,439)	115(69,331)
LC( $n=33$ )	1.86(0,2.36)	2.93(1.48,3.81)	22(16,31)	24(20,31)
RH( $n=22$ )	3.71(2.92,5.17)	5.11(4.00,6.03)	148(41,681)	133(47,367)
$P$ 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

**2.2 血清 HBV RNA 的检出率及表达水平分析** 在慢性 HBV 感染者的 4 个不同自然病程(IT、IC、LC、RH)HBV RNA 阳性率分别为 100.00%、100.00%、69.70%、95.45%;在 HBV DNA < 500 IU/ml 标本中,HBV RNA 检出率为 66.20%。在免疫耐受期  $\log_{10}$  HBV RNA 平均值为 7.25  $\log_{10}$  IU/ml,免疫清除期  $\log_{10}$  HBV RNA 平均值为 6.88  $\log_{10}$  IU/ml,低复制期  $\log_{10}$  HBV RNA 平均值为 1.86  $\log_{10}$  IU/ml,再活动期  $\log_{10}$  HBV RNA 平均值为 3.71  $\log_{10}$  IU/ml。因此 HBV RNA 定量在免疫耐受期水平最高,其次是免疫清除期,但这 2 组间表达不存在显著差异,再活动期次之,低复制期水平最低,其余阶段两两比较,差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。

**2.3 血清 HBV RNA 与 HBV DNA 的相关性分析** 血清 HBV RNA 与 HBV DNA 成正相关( $r = 0.921, P < 0.001$ )。在 HBeAg 阳性组中,血清 HBV RNA 与 HBV DNA 成正相关( $r = 0.852, P < 0.001$ )。在 HBeAg 阴性组中,血清 HBV RNA 与 HBV DNA 成正相关( $r = 0.758, P < 0.001$ )。

**2.4 血清 HBV RNA 与 HBsAg 的相关性分析** 血清 HBV RNA 与 HBsAg 成正相关( $r = 0.789, P <$

$0.001$ )。在 HBeAg 阳性组中,血清 HBV RNA 与 HBsAg 成正相关( $r = 0.621, P < 0.001$ )。在 HBeAg 阴性组中,血清 HBV RNA 与 HBsAg 成正相关( $r = 0.587, P < 0.001$ )。

## 3 讨论

慢性乙型肝炎病毒感染严重危害人类的健康。如何有效管理慢乙型肝炎患者,不断寻找可以有效评价慢乙型肝炎患者预后以及指导抗病毒治疗的指标,是目前研究的热点。鲁凤民等<sup>[8]</sup>证实了 HBV 感染者中的 HBV RNA 为 HBV pgRNA,因为 pgRNA 是由感染肝细胞的 cccDNA 转录生成的,所以血清 HBV RNA 的水平能够反应 cccDNA 的转录活性和存在水平。因此,相比于传统的血清学标志物 HBsAg、HBV DNA 等,血清 HBV RNA 水平可以更好地反映肝内病毒转录活性,故其能作为 CHB 患者管理的新型的血清学标志物<sup>[9-10]</sup>。

本研究通过观察 CHB 不同自然病程血清 HBV RNA 的表达水平发现,免疫耐受期和免疫清除期组全部能检测出 HBV RNA,且 HBV RNA 的表达水平在免疫耐受期、免疫清除期、再活动期及低复制期呈逐渐

下降的趋势,虽然免疫耐受期及免疫清除期 HBV RNA 的表达水平差异不是特别显著,可能与样本量过少,2 组间样本量差异大有关系。本研究结果表明,在慢性 HBV 感染的不同自然病程中,血清 HBV RNA 的水平存在差异,与 Wang 等<sup>[11]</sup>的研究结果基本相符。这在临床实践中指导抗病毒治疗的初始评估和随访评估提供了重要的参考价值。在 HBV DNA 处于较低水平或者低于检测下线的情况下,HBV RNA 的检出率仍较高,说明在评估病毒复制活性方面 HBV RNA 比 HBV DNA 更灵敏。本研究显示血清 HBV RNA 水平与 HBV DNA、HBsAg 水平成正相关,所以 HBV RNA 水平可以更好地反映肝内病毒转录活性,来作为 CHB 患者管理的新型的血清学标志物。

本研究表明,在 CHB 4 个不同的自然病程中,免疫耐受期、免疫清除期、低复制期及再活动期的每个时期,患者的 HBV RNA 水平均比 HBV DNA 水平低,本研究结果与 Rokuhara 等<sup>[12]</sup>、贾雯等<sup>[13]</sup>研究结果类似。而随着 CHB 自然病程的进展,机体的免疫应答反应增强,而且随着肝脏纤维化程度的增加,宿主支持 HBV 复制的能力也下降,导致血清 HBV RNA、HBV DNA、HBsAg 水平均逐渐降低<sup>[14-16]</sup>。

因本研究是一个横断面研究,存在一定的局限性。因此一项跟踪慢性 HBV 感染的不同阶段的纵向研究是非常必要的。本研究结果可能为了解血清 HBV RNA 水平在预测慢性 HBV 感染自然病程中的价值提供了参考。

#### 参考文献

- [1] Liu J, Liang W, Jing W, *et al.* Countdown to 2030: eliminating hepatitis B disease, China[J]. *Bulletin of the World Health Organization*, 2019, 97(3): 230-238.
- [2] Guo JT, Guo H. Metabolism and function of hepatitis B virus cccDNA: Implications for the development of cccDNA-targeting antiviral therapeutics[J]. *Antiviral Res*, 2015, 122: 91-100.
- [3] 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.
- [4] Jingjing L, Yu L, Dong D, *et al.* Evolution of an X-linked primate-specific micro RNA cluster[J]. *Mol Biol Evol*, 2010, 27(3): 671-683.
- [5] Terrault NA, Bzowej NH, Chang KM, *et al.* American Association for the Study of Liver Diseases. AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B[J]. *Hepatology*, 2016, 63(1): 261-283.
- [6] 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.
- [7] 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]. *临床肝胆病杂志*, 2019, 35(12): 2648-2669.
- [8] 鲁凤民, 王杰, 庄辉. HBV RNA 病毒样颗粒的潜在临床意义[J]. *中华肝脏病杂志*, 2016, 32(9): 1635-1636.
- [9] 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.
- [10] Wang XM, Chi XM, Wu RH, *et al.* Serum HBV RNA correlated with intrahepatic cccDNA more strongly than other HBV markers during peg-interferon treatment[J]. *Viral J*, 2021, 18(1): 4.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 贾雯, 计焱焱, 张继明. 不同临床时期乙型肝炎病毒感染者血清病毒核糖核酸水平的比较[J]. *肝脏*, 2015, 20(1): 4-7.
- [14] Kim YJ, Cho HC, Choi MS, *et al.* The change of the quantitative HBsAg level during the natural course of chronic hepatitis B[J]. *Liver Int*, 2011, 31(6): 817-823.
- [15] Martinot - Peignoux M, Carvalho - Filho R, Lapalus M, *et al.* Hepatitis B surface antigen serum level is associated with fibrosis severity in treatment-naive, e antigen-positive patients[J]. *J Hepatol*, 2013, 58(6): 1089-1095.
- [16] Nguyen T, Thompson AJ, Bowden S, *et al.* Hepatitis B surface antigen levels during the natural history of chronic hepatitis B: a perspective on Asia[J]. *J Hepatol*, 2010, 52(4): 508-513.

收稿日期:2021-12-31