

· 论著 ·

HBV pgRNA联合cccDNA对慢性乙型肝炎患者抗病毒疗效的预测价值

王学英*

商丘市立医院检验科 (河南 郑州 476000)

【摘要】目的 探究乙型肝炎(HBV) 前基因组 RNA(pgRNA)联合共价闭合环状DNA(cccDNA)对慢性乙型肝炎(CHB)患者抗病毒疗效的预测价值。方法 收集2019年8月至2022年8月期间于本院进行抗病毒治疗的96例CHB患者的临床资料, 根据患者治疗48周后是否获得完全应答分为完全应答组(78例)及非完全应答组(15例)。检测患者不同时间HBV cccDNA和HBV pgRNA水平, Logistic回归分析影响CHB患者获得完全应答的因素, 并应用受试者工作特征(ROC)曲线分析pgRNA与cccDNA联合检测在抗病毒疗效的预测价值。结果 96例患者中78例抗病毒治疗后获得非完全应答; 完全应答组治疗24、48周HBV pgRNA、HBV cccDNA水平均低于非完全应答组($P<0.05$); Logistic回归分析显示, 治疗24周HBV pgRNA、HBV cccDNA高水平及治疗前ALT低水平是影响CHB患者抗病毒治疗无效的独立危险因素($P<0.05$); 经ROC分析显示, HBV pgRNA预测CHB患者抗病毒疗效的AUC值为0.618, 95%CI为0.513~0.716, HBV cccDNA预测的AUC值为0.667, 95%CI为0.561~0.760, 二者联合预测的AUC值为0.881, 95%CI为0.799~0.938。结论 HBV pgRNA与cccDNA在CHB患者抗病毒治疗中下调, 且治疗24周HBV pgRNA联合cccDNA检测对CHB抗病毒疗效具有更高的预测价值。

【关键词】乙型肝炎; 前基因组 RNA; 共价闭合环状DNA; 抗病毒治疗

【中图分类号】R512.6+2

【文献标识码】A

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2024.4.022

Changes and Significance of Combined Detection of HBV pgRNA and cccDNA in Antiviral Therapy for Patients with Chronic Hepatitis B

WANG Xue-ying*

Shangqiu City Hospital, Zhengzhou 476000, Henan (Province), China

Abstract: *Objective* To explore the predictive value of hepatitis B (HBV) pre-genomic RNA (pgRNA) combined with covalently closed circular DNA (cccDNA) for antiviral efficacy in patients with chronic hepatitis B (CHB). *Methods* Clinical data of 96 patients with CHB who received antiviral therapy in our hospital from August 2019 to August 2022 were collected. Patients were divided into complete response group (78 cases) and incomplete response group (15 cases) according to whether they received complete response after 48 weeks of treatment. The HBV cccDNA and HBV pgRNA levels were detected at different times, and the factors influencing the complete response of CHB patients were analyzed by Logistic regression. The predictive value of pgRNA and cccDNA in antiviral efficacy was analyzed by receiver operating characteristic (ROC) curve. *Results* Of the 96 patients, 78 obtained an incomplete response after antiviral therapy. The levels of HBV pgRNA and HBV cccDNA in the complete response group were lower than those in the incomplete response group before treatment, 24 weeks and 48 weeks after treatment ($P<0.05$). Logistic regression analysis showed that high levels of HBV pgRNA and HBV cccDNA at 24 weeks of treatment and low levels of ALT before treatment were independent risk factors for ineffective antiviral therapy in CHB patients ($P<0.05$). ROC analysis showed that the AUC value of HBV pgRNA in predicting the antiviral efficacy of CHB patients was 0.618, and 95%CI was 0.513-0.716. The predicted AUC value of HBV cccDNA was 0.667 and 95%CI was 0.561~0.760. The combined predicted AUC value was 0.881, and 95%CI was 0.799~0.938. *Conclusion* HBV pgRNA and cccDNA are down-regulated in antiviral therapy for CHB patients. HBV pgRNA combined with cccDNA detection at 24 weeks of treatment has higher predictive value for antiviral efficacy of CHB.

Keywords: Hepatitis B; Pregenomic RNA; Covalently Closed Circular DNA; Antiviral Therapy

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)是由乙型肝炎病毒(HBV)感染引起的慢性肝脏疾病, 临床症状不明显或有恶心、乏力、肝部疼痛等表现, 若不及时干预会加重病情, 影响肝脏正常功能甚至有发展为肝硬化、肝癌的风险^[1-2]。抗病毒治疗是临床较为常用的治疗方案, 但研究发现, 治疗后仍有部分患者无法获得完全应答, 因此, 有效预测并提高抗病毒疗效对于CHB患者具有重要意义。HBV共价闭合环状DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA)是HBV前基因组RNA(progenomic RNA, pgRNA)复制的模板, 并经转录、翻译, 参与CHB的发生与发展^[3]。研究发现, 肝细胞中cccDNA仅有少量拷贝, 但对HBV的复制及CHB的感染发挥重要作用^[4]。pgRNA在感染肝细胞时, 会向血液中释放病毒颗粒, 且pgRNA是一种cccDNA转录的mRNA, 能够反映cccDNA的转录活性^[5-6]。因此推测pgRNA、cccDNA水平与抗病毒效果有关, 本研究对抗病毒治疗过程中pgRNA、cccDNA水平的变化进行探究, 并分析二者联合检测在预测患者疗效中的意义, 以期提高CHB患者抗病毒疗效。

1 资料和方法

1.1 一般资料 收集2019年8月至2022年8月期间本院收治的96例CHB患者的临床资料, 其中男性57, 女性39例; 年龄20~50岁, 平均(38.97±5.62)岁。

纳入标准: 参照《慢性乙型肝炎防治指南》^[7], 患者均确诊为CHB; 患者HBsAg、HBeAg阳性; ALT水平远超正常水平; 患者均行抗病毒治疗, 药物选用恩替卡韦治疗48周。排除标准: 对治疗所用药物过敏者; 患有其他肝部疾病; 既往进行过HBV相关治疗; 处于孕期或哺乳期者; 患有恶性肿瘤者; 依从性较差, 未完成抗病毒治疗者。书。本研究经我院医学伦理委员会批准, 患者均签署知情同意。

1.2 方法

1.2.1 患者临床资料 收集患者病历, 统计患者年龄、性别、身体质量指数(BMI)、病程、高血压、糖尿病、高脂血症、肝硬化及HBV家族史; 采集患者治疗前血液样本, 低温离心, 并取上层血清, 采用酶联免疫法检测天门冬氨酸氨基转移酶(ALT)、谷丙转氨酶(ALT)水平, 评估患者肝脏炎症分级及纤维化分级^[8][采用炎症活动度评分评估肝脏炎症分级, 采用Ishak评分评估纤维化分级]。

【第一作者】王学英, 女, 主管技师, 主要研究方向: 临床检验方向。E-mail: yujiajie22222@163.com

【通讯作者】王学英

1.2.2 HBV cccDNA、pgRNA检测 所有患者分别于治疗前、治疗24、48周采集血液样本，低温离心并提取上层血清备用，取部分血清，提取血清总DNA(试剂盒货号：Cells-Z2184，美国ScienCell公司)，加入DNA酶对提取的核酸进行酶切，引物扩增后，采用荧光定量PCR检测血清cccDNA[试剂盒货号：YLK-PCR0123，优利科(上海)生命科学有限公司]，pgRNA(试剂盒货号：BES233098P；上海博尔森生物科技有限公司)水平，并根据扩增曲线计算cccDNA、pgRNA拷贝数，引物序列见表1。

1.2.3 抗病毒疗效评估^[9] 治疗48周后进行抗病毒效果评估，病毒学应答：HBV DNA载量低于基线 $\geq 2 \log_{10}$ IU/ml或低于检测下限(< 500 IU/ml)；生化学应答：ALT水平下降至的正常水平(40 U/L)；血清学应答：HBeAg阴性，同时未伴随抗HBeAg；完全应答：同时获得病毒学应答及生化学应答。

1.3 统计学方法 采用SPSS 21.0进行数据分析，计数资料、计量资料分别采用n(%)、($\bar{x} \pm s$)表示，分别行 χ^2 检验及t检验；采用Logistic回归分析影响CHB患者获得完全应答的因素；参考受试者工作特征(ROC)曲线及曲线下面积(AUC)评估pgRNA与cccDNA在CHB患者抗病毒疗效中的预测价值； $P<0.05$ 即差异有显著性。

2 结果

2.1 两组治疗效果比较 抗病毒治疗后，获得病毒学应答者91例(94.79%)，获得生化学应答者85例(88.54%)，血清学应答者10例(10.42%)；78例获得非完全应答，完全应答率为81.25%。

2.2 两组HBV pgRNA、HBV cccDNA水平比较 完全应答组治疗24、48周HBV pgRNA、HBV cccDNA水平均低于非完全应答组($P<0.05$)；与治疗前比较，两组治疗24、28周的HBV pgRNA、

HBV cccDNA水平降低，与治疗24周比较，治疗48周HBV pgRNA、HBV cccDNA水平降低($P<0.05$)，见表2。

2.3 两组CHB患者临床资料比较 两组患者的年龄、性别、体质指数(BMI)、高血压、糖尿病、高脂血症、肝硬化、HBV家族史、肝纤维化程度、肝纤维化程度、AST水平比较，差异无显著性($P>0.05$)，完全应答组ALT水平高于非完全应答组($P<0.05$)，见表3。

2.4 抗病毒无效的多因素Logistic回归分析 将连续变量治疗24周HBV pgRNA、HBV cccDNA及ALT作为自变量，抗病毒疗效作为因变量(完全应答=1、非完全应答=0)纳入多因素Logistic回归分析模型，结果显示，治疗24周HBV pgRNA、HBV cccDNA高水平及治疗前ALT低水平是影响CHB患者抗病毒治疗无效的独立危险因素($P<0.05$)，见表4。

2.5 HBV pgRNA与cccDNA对抗病毒疗效的预测价值 经ROC分析显示，治疗24周HBV pgRNA预测CHB患者抗病毒疗效的AUC值为0.618，95%CI为0.513~0.716，治疗24周HBV cccDNA预测的AUC值为0.667，95%CI为0.561~0.760，二者联合预测的AUC值为0.881，95%CI为0.799~0.938，联合预测价值高于单独预测($P<0.05$)。见表5、图1。

表1 引物序列

基因	引物序列	长度
cccDNA	c-F: 5' -GTAGCGCACCTGTCTGGT-3'	18 bp
	c-R: 5' -GAGCCAGCTTGGAGGAC-3'	
pgRNA	c-F: 5' -ATCTAATGCTGCCATTGCCA-3'	20 bp
	c-R: 5' -GAAGGTCTTCGGCAACCTG-3'	

表2 两组HBV pgRNA、HBV cccDNA水平比较(log10拷贝/mL)

组别	n	HBV pgRNA			HBV cccDNA		
		治疗前	治疗24周	治疗48周	治疗前	治疗24周	治疗48周
完全应答组	78	5.49 $\pm$ 0.56	5.08 $\pm$ 0.47 ^a	4.12 $\pm$ 0.35 ^{ab}	3.98 $\pm$ 0.39	3.34 $\pm$ 0.31 ^a	2.56 $\pm$ 0.24 ^{ab}
非完全应答组	18	5.62 $\pm$ 0.75	6.55 $\pm$ 0.61 ^a	5.27 $\pm$ 0.48 ^{ab}	4.02 $\pm$ 0.45	4.35 $\pm$ 0.39 ^a	3.44 $\pm$ 0.37 ^{ab}
t		0.830	11.283	11.670	0.381	11.851	12.547
P		0.409	<0.001	<0.001	0.704	<0.001	<0.001

注：与治疗前比较，^a $P<0.05$ ；与治疗24周比较，^b $P<0.05$ 。

表3 两组CHB患者临床资料比较[n(%)]

因素	完全应答组(n=78)	非完全应答组(n=18)	t/ χ^2 值	P值
年龄	38.72 $\pm$ 5.81	39.21 $\pm$ 5.43	0.326	0.745
性别			0.134	0.714
男	47(60.26%)	10(55.56%)		
女	31(39.74%)	8(44.44%)		
BMI(kg/m ²)	22.08 $\pm$ 2.31	22.41 $\pm$ 1.97	0.560	0.577
病程(年)	1.21 $\pm$ 0.21	1.30 $\pm$ 0.29	1.519	0.132
高血压			0.731	0.392
有	11(14.10%)	4(22.22%)		
无	67(85.90)	14(77.78%)		
糖尿病			1.185	0.276
有	13(16.67%)	5(27.78%)		
无	65(83.33%)	13(72.22%)		
高脂血症			1.038	0.308
有	10(12.82%)	4(22.22%)		
无	68(87.18%)	14(77.78%)		
肝硬化			0.612	0.434
有	19(24.36%)	6(33.33%)		
无	59(75.64%)	12(66.67%)		
HBV家族史			0.185	0.667
有	10(12.82%)	3(16.67%)		
无	68(87.18%)	15(83.33%)		
肝纤维化程度(分)	7.33 $\pm$ 2.15	7.10 $\pm$ 2.26	0.420	0.676
肝炎症活动度(分)	2.21 $\pm$ 0.68	2.35 $\pm$ 0.72	0.805	0.424
AST(U/L)	67.86 $\pm$ 7.08	68.03 $\pm$ 7.21	0.092	0.927
ALT(U/L)	157.33 $\pm$ 21.86	95.95 $\pm$ 12.15	11.479	<0.001

表4 抗病毒无效的多因素Logistic回归分析

影响因素	β	SE	Wald χ^2	P	OR	95%CI
治疗24周HBV cccDNA	1.286	0.391	10.818	<0.001	3.618	1.591~8.231
治疗24周HBV pgRNA	1.359	0.415	10.724	<0.001	3.892	1.711~8.854
治疗前ALT	1.295	0.427	9.198	<0.001	3.651	1.605~8.305

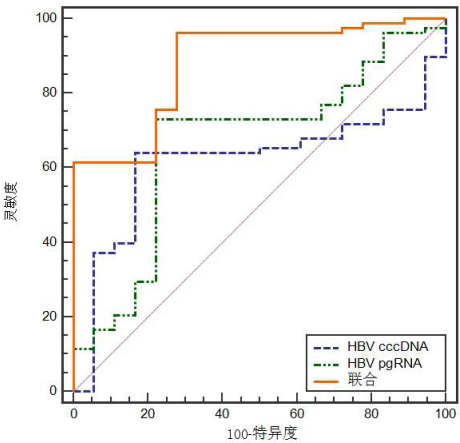


图1 治疗24周HBV pgRNA与cccDNA预测抗病毒疗效的ROC曲线

表5 治疗24周HBV pgRNA与cccDNA对抗病毒疗效的预测价值

指标	截断值	灵敏度	特异度	AUC	95%CI	约登指数
HBV cccDNA	4.62log10拷贝/mL	64.10%	83.33%	0.618	0.513~0.716	0.474
HBV pgRNA	6.33log10拷贝/mL	73.08%	77.78%	0.667	0.561~0.760	0.508
联合	-	96.15%	72.22%	0.881	0.799~0.938	0.684

3 讨论

cccDNA存在于宿主细胞核中，是HBV DNA在核内的主要存在形式，目前的抗病毒药物无法彻底清除cccDNA，这也是导致CHB后期复发的关键因素^[9]。临床数据显示，相较于乙肝表面抗原，血清pgRNA操作简单、无创，更能够反映肝细胞内cccDNA的转录活性^[10]。基于上述背景推测，cccDNA、pgRNA检测对于预测抗病毒疗效，具有一定的参考价值。本研究对96例CHB患者的临床资料进行回顾性分析，以期CHB患者提供新的疗效预测方案。

96例患者中78例获得非完全应答，完全应答率为81.25%，提示抗病毒治疗中仍有部分CHB患者无法获得完全应答，若能提前预测抗病毒疗效，提前进行干预，则能够提高抗病毒疗效。本研究显示，完全应答组治疗前、治疗24周、48周HBV pgRNA、cccDNA水平低于非完全应答组，表明获得完全应答的CHB患者血清中HBV pgRNA、cccDNA水平明显低于非完全应答组，经Logistic回归分析，治疗24周HBV pgRNA、HBV cccDNA高水平及治疗前ALT低水平是影响CHB患者抗病毒治疗无效的独立危险因素。分析原因为，cccDNA的合成、转录在CHB的发展过程中均发挥重要作用，目前抗病毒治疗能够通过阻断细胞感染或抑制病毒复制，从而阻断cccDNA的合成过程^[11]。研究发现，当肝脏处于炎症状态下，肝内cccDNA大量释放至血液中，cccDNA水平升高，而cccDNA的合成是HBV感染细胞并在细胞内复制的起点，因此，cccDNA水平越高，HBV病情越严重，治疗效果受到限制，影响抗病毒疗效^[12-13]。HBV pgRNA是一种新型HBV血清学标志物，在抗病毒治疗过程中能够灵敏反映HBV的复制情况，pgRNA水平越低，表明HBV受抑制程度越高，抗病毒疗效越好，同时pgRNA是cccDNA转录生成HBV的重要中间物质，pgRNA下降同样表明cccDNA的转录后活性降低，进一步表明抗病毒疗效较好，对预测抗病毒疗效具有较高的参考价值^[14-15]。治疗前ALT高度患者对抗病毒治疗反应效果较好，可能与CHB患者的免疫反应较好有关。本研究进行经ROC分析显示，HBV cccDNA、pgRNA预测抗病毒疗效的AUC值为0.618、0.667，二者联合的AUC为0.881，提示临床应对治疗24周HBV pgRNA水平低于4.62log10拷贝/mL，HBV cccDNA水平低于6.33log10拷贝/mL的CHB患者进行重点监测，并采取相应干预，提高抗病毒治疗完全应答率。

综上所述，HBV pgRNA与cccDNA在CHB患者在抗病毒治疗中下调，且治疗24周HBV pgRNA联合cccDNA检测对CHB抗病毒疗效具有更高的预测价值，治疗前可检测两指标水平以选择合适治疗方案提高抗病毒疗效。

参考文献

- [1] Chien RN, Liaw YF. Current Trend in Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis B[J]. Viruses, 2022, 14 (2): 434.
- [2] 卢艳玲, 李小红, 陈海涛. 慢性乙型肝炎患者血清HBV pgRNA与HBV DNA和HBeAg水平变化关系研究[J]. 肝脏, 2022, 27 (3): 302-304.
- [3] 张诗琬, 陈星, 刘娇, 等. 慢性乙型肝炎患者停用核苷(酸)类似物后循环血清中HBV pgRNA、HBcrAg表达水平与复发的相关性分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2023, 39 (1): 56-62.
- [4] 朱雪丽, 林照坤, 王丽芸. HBV pgRNA表达水平与慢性乙型肝炎患者核(甘)酸类似物治疗反应性的相关性[J]. 实用医学杂志, 2022, 38 (20): 2585-2589, 2596.
- [5] 陈红, 黄富敏, 琳杰, 等. 慢性HBV感染患者血清pgRNA的表达及意义[J]. 中华医院感染学杂志, 2022, 32 (6): 880-884.
- [6] 丁斯博, 刘春. 肝癌患者血清乙肝病毒e抗原与肝细胞HBVcccDNA水平的相关性研究[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2021, 28 (8): 959-961.
- [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]. 中华肝脏病杂志, 2019, 27 (12): 938-961.
- [8] 安宝燕, 蔡伟, 王晖, 等. 聚乙二醇干扰素 α -2b治疗HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者的疗效及影响因素[J]. 肝脏, 2013, 18 (3): 146-149.
- [9] 王颖, 赵奎, 秦建忠. HBV cccDNA、HBsAg、HBV pgRNA联合检测对恩替卡韦治疗HBeAg阳性慢性乙型肝炎效果的预测价值[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36 (5): 1008-1013.
- [10] 赵敏, 张诗琬, 冉紫晶, 等. 初次接受恩替卡韦治疗的CHB患者血清HBV pgRNA、HBcrAg水平动态观察[J]. 山东医药, 2022, 62 (15): 33-37.
- [11] 于彤波, 付伦, 赵汉东, 等. 血清HBV pgRNA在核苷类似物治疗CHB患者中的临床价值[J]. 检验医学与临床, 2022, 19 (21): 2881-2884, 2889.
- [12] 王春莹, 屈耀宁, 乔炜, 等. 恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎患者血清HBV cccDNA和HBV pgRNA水平变化[J]. 实用肝脏病杂志, 2022, 25 (5): 641-644.
- [13] 饶希, 施欢欢, 吴振平, 等. 长期核苷类似物治疗的慢性乙型肝炎患者血清HBV pgRNA与抗原状态变化的相关性研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2021, 29 (8): 766-770.
- [14] 曾伊凡, 王传敏, 何雨倩, 等. 经核苷(酸)类似物治疗的慢性乙型肝炎患者血清乙肝病毒前基因组RNA的临床意义[J]. 临床内科杂志, 2022, 39 (11): 751-754.
- [15] 刘忠伟, 刘明, 龚红梅, 等. 血清pgRNA对聚乙二醇干扰素治疗低HBeAg水平慢性乙型肝炎患者HBeAg清除的预测意义[J]. 第三军医大学学报, 2022, 44 (2): 155-161.

(收稿日期: 2023-04-25)

(校对编辑: 孙晓晴)