

HBV RNA 检测在慢性乙型肝炎中的临床价值

马艳婷¹, 苏曦¹, 黄斐¹, 王梦娴¹, 沈敏娜¹, 张春燕², 王蓓丽¹, 潘柏申¹, 郭玮¹

(1. 复旦大学附属中山医院检验科, 上海 200032;

2. 复旦大学附属中山医院厦门医院检验科, 福建 厦门 361015)

摘要: **目的** 对检测乙型肝炎病毒 (HBV) RNA 的方法进行评估, 比较不同乙型肝炎血清标志物模式患者血清 HBV RNA 水平及其与 HBV DNA 之间的相关性。**方法** 对 HBV RNA 检测方法的精度密、灵敏度及线性范围进行评估。收集 81 例乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 阳性慢性乙型肝炎患者的血清, 同时检测 HBV RNA、HBV DNA 及乙型肝炎血清学标志物。按乙型肝炎 e 抗原 (HBeAg) 是否阳性、不同乙型肝炎血清标志物模式及是否接受抗病毒药物治疗分别分组。**结果** HBV RNA 高值、低值样本的批内精密密度分别为 0.56%、2.30%, 批间精密密度分别为 3.13%、6.03%, 均符合临床要求; 对接近厂商声明的检测下限的样本重复检测 20 次, 检出率为 100%, 灵敏度符合要求; 在 HBV RNA $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^7$ 拷贝/mL 范围内成线性。HBeAg 阳性组血清 HBV RNA 和 HBV DNA 载量均高于 HBeAg 阴性组 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。在不同乙型肝炎血清标志物模式中, HBeAg 阳性且乙型肝炎 e 抗体 (HBeAb) 阴性患者血清 HBV RNA 载量最高 ($P < 0.01$)。未治疗组血清 HBV DNA 及 HBV RNA 载量均高于治疗组 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。在 81 例慢性乙型肝炎患者中, HBV RNA 水平与 HBV DNA 载量、HBeAg 阳性滴度呈正相关 (r 值分别为 0.348、0.544, $P < 0.05$), 与 HBsAg 滴度无相关性 ($r = 0.04$, $P > 0.05$)。在 HBeAg 阳性的慢性乙型肝炎患者中, 血清 HBV RNA 载量与血清 HBV DNA 载量呈正相关 ($r = 0.338$, $P < 0.05$)。在 HBeAg 阴性的慢性乙型肝炎患者中, 血清 HBV RNA 载量与血清 HBV DNA 载量无相关性 ($r = 0.14$, $P > 0.05$)。**结论** 血清 HBV RNA 是一种潜在的反映 HBV 活动的新型标志物, 亦可用于 HBV 感染疗效监测。

关键词: 乙型肝炎病毒 RNA; 乙型肝炎病毒 DNA; 慢性乙型肝炎

Clinical role of HBV RNA detection in chronic hepatitis B MA Yanting¹, SU Xi¹, HUANG Fei¹, WANG Mengxian¹, SHEN Minna¹, ZHANG Chunyan², WANG Beili¹, PAN Baishen¹, GUO Wei¹. (1. Department of Clinical Laboratory, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Xiamen Branch, Zhongshan Hospital, Fudan University, Xiamen 361015, Fujian, China)

Abstract: Objective To evaluate the performance of a method for the detection of hepatitis B virus (HBV) RNA, to compare serum HBV RNA levels in patients with different results of serological markers of HBV infection, and to evaluate the relationship between HBV RNA and HBV DNA. **Methods** The performance of the method for HBV RNA detection was evaluated, which included precision, sensitivity and linearity. The sera of 81 patients with hepatitis B surface antigen (HBsAg) -positive chronic hepatitis B were collected, and the levels of HBV RNA, HBV DNA and serological markers were detected simultaneously. The patients were classified according to the different results of hepatitis B e antigen (HBeAg), serological markers of HBV infection and medication. **Results** The intra-assay precisions of high and low HBV RNA values were 0.56% and 2.30%, and the inter-assay precisions

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81772263); 国家自然科学基金面上项目 (81972000); 国家自然科学基金青年项目 (81902139); 国家重点研发计划“精准医学研究”重点专项课题 (2017YFC0910003); 上海市临床重点专科建设项目 (shslczdzk03302); 厦门市医疗卫生重点项目 (YDZX20193502000002); 复旦大学附属中山医院临床研究专项基金 (2018ZSLC05)

作者简介: 马艳婷, 女, 1996年生, 学士, 技师, 主要从事乙型肝炎病毒 RNA 临床应用研究。

苏曦, 女, 1977年生, 主管技师, 主要从事分子生物学检测工作。

马艳婷与苏曦对本研究具有同等贡献, 并列第一作者。

通信作者: 郭玮, E-mail: guo.wei@zs-hospital.sh.cn。

were 3.13% and 6.03%, respectively, which all met the clinical requirements. The sensitivity of the assay was achieved by repeating the assay 20 times for samples close to the lower limit of detection stated by the manufacturer, and the detection rate was 100%, which met the clinical requirement. It was linear in the range of HBV RNA 1.0×10^2 - 1.0×10^7 copies/mL. Serum HBV RNA and HBV DNA loads in HBeAg-positive group were higher than those in HBeAg-negative group ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and the HBeAg-positive and hepatitis B e antibody (HBeAb)-negative group had the highest HBV RNA loads among all the groups with different results of serological markers of HBV infection ($P < 0.01$). Serum HBV DNA and HBV RNA loads were higher in untreated group than those in treated group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). In 81 patients with chronic hepatitis B, HBV RNA loads were positively correlated with HBV DNA load and HBeAg positive titer ($r = 0.348$ and 0.544 , respectively, $P < 0.05$) and without HBsAg titer ($r = 0.04$, $P > 0.05$). In HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B, serum HBV RNA loads were positively correlated with serum HBV DNA load ($r = 0.338$, $P < 0.05$). In HBeAg-negative patients with chronic hepatitis B, serum HBV RNA levels did not correlate with serum HBV DNA load ($r = 0.14$, $P > 0.05$).

Conclusions Serum HBV RNA level is a potential new marker for monitoring the viral activity and therapeutic efficacy of HBV infection.

Key words: Hepatitis B virus RNA; Hepatitis B virus DNA; Chronic hepatitis B

由乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染导致的慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 会发展成肝衰竭、肝硬化及肝癌, 已成为严重的公共卫生问题^[1]。用于治疗 CHB 的药物主要为核苷类似物 (nucleotide analogue, NA)^[2]。然而, NA 并不能完全清除肝细胞内的共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA), cccDNA 持续存在是导致 CHB 久治不愈的根本原因。目前, 最可靠的 cccDNA 检测样本是肝脏组织, 但其获取及后续的分纯化难度较大, 无法进行动态观察。因此, 临床亟需一种能够反映肝脏内病毒感染进程以及监测 cccDNA 活性的替代指标。其他乙型肝炎血清学标志物, 如 HBV DNA、乙型肝炎表面抗原 (hepatitis B surface antigen, HBsAg)、乙型肝炎核心相关抗原 (hepatitis B core-related antigen, HBcrAg) 被证实与肝细胞内 cccDNA 有关^[3]。然而, 目前临床上以 HBV DNA 持续低于检出下限为停药指标的患者仍有很高的疾病复发率^[4]。近年来, 有研究发现血清中存在 HBV RNA^[5], 这些 HBV RNA 是包裹在病毒样颗粒内的未经或部分逆转录的前基因组 RNA (pregenomic RNA, pgRNA), 其能够直接获得病毒外膜并释放入血, 可反映 cccDNA 活性^[6-7]。有研究发现, HBV RNA 与 HBV DNA、乙型肝炎 e 抗原 (hepatitis B e antigen, HBeAg)

均有一定的相关性, 因此或可将血清 HBV RNA 作为一种新的潜在的指标来监测病毒复制情况和评价药物疗效^[8]。目前, 国际上尚无标准化的血清 HBV RNA 检测方法, 本研究对 HBV RNA 定量检测试剂盒进行了评估, 并探讨 HBV RNA 的临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 研究对象

选取复旦大学附属中山医院临床确诊为 CHB 的患者 81 例, 其中男 66 例、女 15 例, 年龄 25 ~ 79 岁。接受抗病毒药物 [NA (替诺福韦、恩替卡韦、拉米夫定、阿德福韦酯)] 治疗者 49 例, 未接受抗病毒药物治疗者 32 例。所有患者血清 HBsAg 均为阳性。根据乙型肝炎血清标志物的不同模式将患者分为 4 组: 第 1 组, HBeAg 和乙型肝炎 e 抗体 (hepatitis B e antibody, HBeAb) 均为阳性, 共 20 例; 第 2 组, HBeAg 阴性、HBeAb 阳性, 共 18 例; 第 3 组, HBeAg 阳性、HBeAb 阴性, 共 20 例; 第 4 组, HBeAg 和 HBeAb 均为阴性、乙型肝炎核心抗体 (hepatitis B core antibody, HBcAb) 为阳性, 共 23 例。排除有肝移植及输血史的患者。

1.2 方法

1.2.1 样本采集 采集所有对象静脉血, 4 h 内分离血清, 置于 1.5 mL 离心管中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。

1.2.2 HBV RNA 定量检测 取 200 μL 血清,

使用核酸提取或纯化试剂盒（湖南圣湘公司，批号S1006）提取HBV RNA。采用HBV RNA定量检测试剂盒（湖南圣湘公司）检测HBV RNA。检测仪器为ABI 7500荧光定量PCR扩增仪（美国ABI公司）。PCR扩增体系为50 μ L，反应条件：95 $^{\circ}$ C 1 min；60 $^{\circ}$ C 30 min；95 $^{\circ}$ C 1 min；95 $^{\circ}$ C 15 s，60 $^{\circ}$ C 31 s，共45个循环；25 $^{\circ}$ C 10 s。60 $^{\circ}$ C采集荧光信号。所有检测结果必须满足以下要求：阴性质控FAM通道无循环阈值（cycle threshold, Ct）显示，VIC通道Ct \leq 35；阳性对照HBV RNA载量为 $1.0\times 10^4\sim 1.0\times 10^6$ 拷贝/mL；4个定量参考品检测均为阳性，且标准曲线相关性 $r^2\geq 0.98$ 。试剂盒检测线性范围为 $1.0\times 10^2\sim 1.0\times 10^9$ 拷贝/mL。以HBV RNA $>1.0\times 10^2$ 拷贝/mL为阳性。

1.3 方法学性能验证

参照中国合格评定国家认可委员会（China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS）发布的CNAS-GL039：2019《分子诊断检验程序性能验证指南》进行性能验证。

1.3.1 精密度 将预混血清样本分装后-20 $^{\circ}$ C保存。（1）批内精密度。分别在同一批次中对高值（ 10^5 拷贝/mL）和低值（ 10^3 拷贝/mL）混合血清样本重复提取20次，检测20次。（2）批间精密度。分别对高值（ 10^5 拷贝/mL）和低值（ 10^3 拷贝/mL）混合血清样本连续检测5 d，每天各重复提取4次、检测4次，共检测5批次，总计检测高值和低值样本各20份。计算变异系数（coefficient of variation, CV）。要求CV $\leq 10\%$ 。

1.3.2 灵敏度 使用阴性血清将高值阳性临床混合血清样本稀释至接近试剂盒厂商声明的检测下限（ 1.0×10^2 拷贝/mL），对稀释后的血清重复提取并检测20次，检测结果符合阳性判定标准，要求检出率 $\geq 95\%$ 。

1.3.3 线性范围 使用阴性血清对高值阳

性样本（ 2.20×10^7 拷贝/mL）进行梯度稀释（ $1.0\times 10^2\sim 1.0\times 10^7$ 拷贝/mL），在同一批次中对稀释样本进行检测，每个梯度重复检测3次，对测定值进行线性回归分析，通过计算测定值与理论值的线性相关系数得到直线回归方程 $Y=bX+a$ 。如满足 b 在 1 ± 0.05 范围内， $r^2>0.98$ ，则可判定该方法在该浓度范围内成线性。

1.3.4 临床应用评估 采用NATCH-S全自动核酸提取仪（湖南圣湘公司）抽提81例CHB患者血清样本中的核酸，使用乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒（湖南圣湘公司）在LightCycler 480荧光定量PCR扩增仪（瑞士Roche公司）上定量检测HBV DNA。PCR扩增体系共50 μ L，反应条件：50 $^{\circ}$ C 2 min；95 $^{\circ}$ C 2 min；95 $^{\circ}$ C 15 s，58 $^{\circ}$ C 30 s，45个循环；37 $^{\circ}$ C 10 s。线性范围为 $5.0\times 10^1\sim 5.0\times 10^8$ 拷贝/mL。同时使用Elecsys 2010电化学发光全自动免疫分析仪（瑞士Roche公司）及配套试剂（电化学发光法）对HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb项目进行半定量检测。

1.4 统计学方法

对于HBV RNA或HBV DNA低于检出下限的数据，采用单值填补法和左删失数据来表示。采用SPSS 22.0软件进行统计分析。呈非正态分布的计量资料以中位数（ M ）[四分位数（ $P_{25}\sim P_{75}$ ）]表示，2个组之间比较采用Mann-Whitney U 检验，多组间比较采用Kruskal-Wallis检验，两两比较采用Bonferroni t 检验。将HBV RNA数据进行常用对数（lg）转换后再进行统计分析。相关性分析采用Spearman相关分析，线性回归采用简单线性回归分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 精密度验证

高值、低值样本的批内精密度（CV）分别为0.56%、2.30%，批间精密度（CV）分别为3.13%、6.03%，均符合临床要求（CV $\leq 10\%$ ）。见表1。

表1 精密度验证结果

样本	批内精密度			批间精密度		
	均值/（拷贝/mL）	标准差/（拷贝/mL）	CV/%	均值/（拷贝/mL）	标准差/（拷贝/mL）	CV/%
高值	2.51×10^5	1.41×10^3	0.56	5.62×10^5	1.76×10^4	3.13
低值	1.10×10^3	2.53×10^1	2.30	1.41×10^3	8.50×10^1	6.03

2.2 灵敏度验证

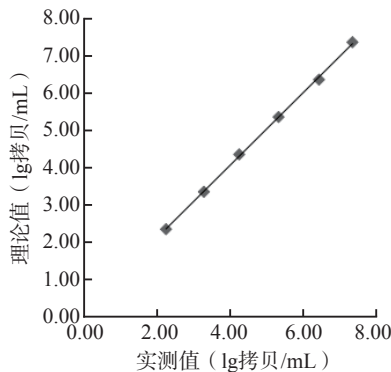
将高值阳性血清稀释至接近厂商声明的检出限 (1.0×10^2 拷贝/mL), 重复提取并检测 20 次。20 次均能检出, 检出率为 100%, HBV RNA 均值为 $1.300 5 \times 10^2$ 拷贝/mL, CV 为 5.70%, 与厂商声明的灵敏度一致。

2.3 线性范围验证

实测值与理论值的回归方程为 $Y=0.976 9X+0.129 9$ ($r^2=0.999 5$), 表明在 HBV RNA $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^7$ 拷贝/mL 范围内成线性, 符合临床要求。见表 2、图 1。

表 2 线性范围验证结果

样本编号	稀释倍数	理论值/ (拷贝/mL)	实测值/ (拷贝/mL)
1	0	2.20×10^7	2.19×10^7
2	10	2.20×10^6	2.72×10^6
3	100	2.20×10^5	2.15×10^5
4	1 000	2.20×10^4	1.85×10^4
5	10 000	2.20×10^3	2.03×10^3
6	100 000	2.20×10^2	1.89×10^2



注: $Y=0.976 9X+0.129 9$ ($r^2=0.999 5$)。

图 1 实测值与理论值的线性关系

2.4 不同乙型肝炎血清标志物模式患者的 HBV RNA 载量比较

HBeAg 阳性组血清 HBV RNA 和 HBV DNA 载量均高于 HBeAg 阴性组 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。见表 3。

在不同乙型肝炎血清标志物模式中, 第 1 组血清 HBV RNA 阳性率为 80.0%, 第 2 组为 27.8%, 第 3 组为 95.0%, 第 4 组为 37.5%。除第 2 组与第 4 组之间血清 HBV RNA 载量差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 外, 其他各组之间血清 HBV RNA 载量差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 2。

表 3 HBeAg 阳性组与 HBeAg 阴性组血清 HBV RNA 和 HBV DNA 载量比较

组别	例数	HBV RNA/ (拷贝/mL)	HBV DNA/ (拷贝/mL)
HBeAg 阳性组	40	1.2×10^4 ($9.8 \times 10^2 \sim 3.0 \times 10^5$)	8.0×10^2 ($0 \sim 3.3 \times 10^5$)
HBeAg 阴性组	41	0 ($0 \sim 2.7 \times 10^2$)	0 ($0 \sim 3.6 \times 10^3$)
Z 值		-5.866	-1.974
P 值		0.000 1	0.048

注: 空白表示无此项。

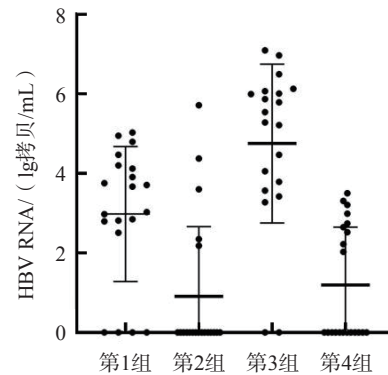


图 2 不同乙型肝炎血清标志物模式各组 HBV RNA 载量比较

2.5 治疗组与未治疗组 HBV RNA 结果比较

将 49 例经抗病毒药物治疗的患者归入治疗组, 32 例未经抗病毒药物治疗的患者归入未治疗组。未治疗组血清 HBV DNA 及 HBV RNA 载量均高于治疗组 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$), 见表 4。治疗组血清 HBV RNA 阳性率 (57.1%) 与未治疗组 (65.6%) 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 4 治疗组与未治疗组血清 HBV RNA 和 HBV DNA 载量比较

组别	例数	HBV RNA/ (拷贝/mL)	HBV DNA/ (拷贝/mL)
未治疗组	32	3.4×10^3 ($0 \sim 1.5 \times 10^5$)	1.3×10^4 ($0 \sim 3.2 \times 10^6$)
治疗组	49	1.3×10^2 ($0 \sim 3.8 \times 10^3$)	0 ($0 \sim 4.4 \times 10^2$)
Z 值		-2.025	-4.182
P 值		0.043 0	0.000 1

注: 空白表示无此项。

2.6 HBV RNA 与 HBV DNA、HBeAg、HBsAg 的相关性

在 81 例 CHB 患者中, HBV RNA 水平与 HBV DNA 载量、HBeAg 阳性滴度呈正相关 (r 值分

别为 0.348、0.544, $P < 0.05$), 与 HBsAg 滴度无相关性 ($r = 0.040$, $P > 0.05$)。在 HBeAg 阳性的 CHB 患者中, 血清 HBV RNA 载量与血清 HBV DNA 载量呈正相关 ($r = 0.338$, $P < 0.05$)。在 HBeAg 阴性的 CHB 患者中, 血清 HBV RNA 载量与血清 HBV DNA 载量无相关性 ($r = 0.140$, $P > 0.05$)。

3 讨论

在 HBV 生存周期中, 以 cccDNA 为模版逆转录生成 RNA 是 HBV 复制的开始, 也是 HBV 持续感染和复发的主要原因^[9-10], 因此 cccDNA 是反映体内 HBV 感染和复制情况最直接的证据。从慢性 HBV 感染患者的肝细胞中清除 cccDNA 是根治 CHB 的关键^[11]。但目前对 cccDNA 的分析仍主要依靠肝组织活检, 过程复杂且具有侵入性, 因此临床亟需能反映病毒感染复制情况、监测 cccDNA 活性的替代标志物。1996 年, 德国学者 KÖCK 等^[5]首次在 CHB 患者的血清中检测到 HBV RNA。自此, 学者们对于 HBV RNA 的检测和临床研究不断深入。

目前, 国际上尚缺乏标准化的血清 HBV RNA 检测方法, 这是当前 HBV RNA 研究的一大难题。本研究对湖南圣湘公司的 HBV RNA 定量检测试剂盒进行了性能评估。结果显示, 高值、低值样本的批内精密度 (CV) 为 0.56%、2.30%, 批间精密度 (CV) 为 3.13%、6.03%, 精密度验证通过; 对接近厂商声明的检测下限的样本重复检测 20 次, 检出率达到 100%, 灵敏度验证通过; 在 HBV RNA $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^7$ 拷贝/mL 范围内成线性。试剂盒性能均满足临床要求, 可用于临床检测。

本研究结果显示, HBeAg 阳性组血清 HBV RNA 和 HBV DNA 载量均高于 HBeAg 阴性组 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。HBV RNA 载量在 2 个组之间差异更为显著, 表明 HBV RNA 是更灵敏的病毒活动监测指标。作为当前应用广泛的乙型肝炎血清标志物, HBV DNA 可以提示 e 抗原的血清学转化^[12]。近年来, 有研究指出 HBV RNA 载量对于 HBeAg 血清学转换有预测作用^[13]。因 HBV RNA 在 HBeAg 阳性患者与阴性患者之间有更为显著的差异, 所以 HBV RNA 或可作为更有效的治疗监测指标。本研究根据不同乙型肝炎

血清标志物模式对 CHB 患者进行分组, 结果显示, HBeAg 阳性的 2 个组 (第 1 组和第 3 组) HBV RNA 载量更高, 其中 HBeAb 同为阳性组 (第 1 组) HBV RNA 载量低于 HBeAb 阴性组 (第 3 组) ($P < 0.01$), 表明 HBeAb 阳性的 CHB 患者血清 HBV RNA 载量低于阴性患者。这是由于 HBeAb 伴随 HBeAg 的消失而出现, 其标志着病毒复制减少、传染性降低, HBV RNA 逆转录效率降低, 导致进入血清中的 HBV RNA 病毒颗粒减少^[14-15]。由此可见, 血清 HBV RNA 可作为一种能更加灵敏且有效地反映病毒复制过程, 提示 HBeAg 血清学转化的潜在标志物。但本研究未能跟踪随访所有 HBeAg 阳性患者的血清学转换情况, 后续将完善这方面的研究。

本研究结果显示, 治疗组血清 HBV RNA 检出率略低于未治疗组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。但未治疗组血清 HBV DNA 和 HBV RNA 载量均高于治疗组 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。表明血清 HBV RNA 亦可作为反映患者肝组织内病毒活动程度及疗效监测的指标。

本研究 Spearman 相关分析结果显示, HBV RNA 载量与 HBV DNA 载量、HBeAg 阳性滴度呈正相关 (r 值分别为 0.348、0.544, $P < 0.05$), 与 HBsAg 滴度无相关性 ($r = 0.040$, $P > 0.05$); 在 HBeAg 阳性的 CHB 患者中, 血清 HBV RNA 载量与血清 HBV DNA 载量呈弱正相关 ($r = 0.338$, $P < 0.05$); 但在 HBeAg 阴性的 CHB 患者中, 血清 HBV RNA 载量与血清 HBV DNA 载量无相关性 ($r = 0.140$, $P > 0.05$)。既往研究结果表明, HBV RNA 与 HBV DNA、HBeAg 和 HBsAg 均有一定程度的相关性^[16], HBeAg 阴性患者 HBV RNA 与 HBV DNA 相关性弱可能是受病毒变异、宿主免疫应答或 cccDNA 表观遗传调控的影响^[17-18]。HBsAg 与血清 HBV RNA 无相关性可能是由于病毒 DNA 整合于宿主 DNA, 之后转录翻译的 HBsAg 来自于整合后的核酸而非病毒的 cccDNA^[19]。本研究得出了几种指标之间相关性较低的结果可能与样本量较小, 结果分析不够全面有关。

综上所述, 血清 HBV RNA 是能灵敏、有效地反映病毒活动的指标, 且与 HBV DNA 和 HBeAg 有一定的相关性, 可提示二者的血清学

变化。临床可联合HBV RNA、HBV DNA和不同乙型肝炎血清标志物模式综合分析病毒感染及治疗情况^[20]，指导用药与停药。由于本研究的样本量较小，且在实际操作过程中HBV RNA极易降解，因此可能对实验结果造成了一定的影响，这些因素需在后续研究中不断完善与修正。总之，血清HBV RNA作为HBV研究领域的新型生物标志物，具有巨大的研究和应用价值。

参考文献

- [1] 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]. 中国肝脏病杂志, 2019, 27(12): 938-961.
- [2] HOU J, WANG G, WANG F, et al. Guideline of prevention and treatment for chronic hepatitis B (2015 Update) [J]. J Clin Transl Hepatol, 2017, 5(4): 297-318.
- [3] WONG D K H, SETO W K, CHEUNG K S, et al. Hepatitis B virus core-related antigen as a surrogate marker for covalently closed circular DNA[J]. Liver Int, 2017, 37(7): 995-1001.
- [4] NASSAL M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B[J]. Gut, 2015, 64(12): 1972-1984.
- [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.
- [6] CHOU S F, TSAI M L, HUANG J Y, et al. The dual role of an ESCRT-0 component HGS in HBV transcription and naked capsid secretion[J]. PLoS Pathog, 2015, 11(10): e1005123.
- [7] 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]. Virol J, 2018, 15(1): 86.
- [8] 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.
- [9] GUO J T, 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.
- [10] DING S, ROBEK M D. Cytidine deamination and cccDNA degradation: a new approach for curing HBV?[J]. Hepatology, 2014, 60(6): 2118-2121.
- [11] CHEN J, WU M, LIU K, et al. New insights into hepatitis B virus biology and implications for novel antiviral strategies[J]. Nat Sci Rev, 2015, 2(3): 296-313.
- [12] TSENG K C, CHENG P N, WU I C, et al. HBV DNA level as an important determinant of e antigen seroconversion of chronic hepatitis B during adefovir dipivoxil therapy[J]. Hepatogastroenterology, 2009, 56(91-92): 813-818.
- [13] VAN BÖMMEL F, BARTENS A, MYSICKOVAA, 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.
- [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.
- [15] LAM A M, 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.
- [16] VAN CAMPENHOUT M J H, VAN BÖMMEL F, PFEFFERKOM M, et al. Host and viral factors associated with serum hepatitis B virus RNA levels among patients in need for treatment[J]. Hepatology, 2018, 68(3): 839-847.
- [17] HONG X, KIM E S, GUO H. Epigenetic regulation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA: implications for epigenetic therapy against chronic hepatitis B[J]. Hepatology, 2017, 66(6): 2066-2077.
- [18] BELLONI L, ALLWEISS L, GUERRIERI F, et al. IFN- α 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.
- [19] WOODDELL C I, YUEN M F, CHAN H L, et al. RNAi-based treatment of chronically infected patients and chimpanzees reveals that integrated hepatitis B virus DNA is a source of HBsAg[J]. Sci Transl Med, 2017, 9(409): ean0241.
- [20] 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: 71-78.

(收稿日期: 2020-11-20, 修回日期: 2021-08-26)

(本文编辑: 龚晓霖)