

HBV pgRNA 在慢性乙型肝炎进程中的可能意义

谭宁, 罗皓, 徐小元

(北京大学第一医院 感染疾病科, 北京 100034)

摘要: HBV pgRNA 是 HBV cccDNA 的直接转录产物, 能够通过反映 HBV cccDNA 的转录活动状态进而反映慢性乙型肝炎病情进展, 指导临床治疗和判断预后。与其他常用 HBV 感染血清标志物相比, HBV pgRNA 在反映 HBV 复制活动和抗病毒治疗效果等方面更灵敏, 对于抗病毒治疗阶段终点有预测价值。通过综合 HBV pgRNA 与 HBcAg、HBV cccDNA 的相关性来阐述 HBV pgRNA 在反映慢性乙型肝炎治疗过程中病情变化的可能意义。

关键词: 肝炎, 乙型, 慢性; HBV pgRNA; HBcAg; 综述

中图分类号: R512.62 **文献标志码:** A **文章编号:** 1008-5256(2018)10-2221-03

Significance of hepatitis B virus pregenomic RNA in the progression of chronic hepatitis B

TAN Ning, LUO Hao, XU Xiaoyuan. (Department of Infectious Diseases, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

Abstract: Hepatitis B virus (HBV) pregenomic RNA (pgRNA) is the direct transcription product of HBV covalently closed circular DNA (cccDNA) and can reflect the transcriptional activity of HBV cccDNA and the progression of chronic hepatitis B, which provides guidance for clinical treatment and prognostic prediction. Compared with other common serological markers for HBV infection, HBV pgRNA is more sensitive in reflecting HBV replication and the effect of antiviral therapy has a certain predictive value for endpoints in the stages of antiviral therapy. This article elaborates on the significance of HBV pgRNA in reflecting the changes in disease conditions with reference to the correlation of HBV pgRNA with HBcAg and HBV cccDNA.

Key words: hepatitis B, chronic; HBV pregenomic RNA; hepatitis B core-related antigen; review

有研究^[1]在关于乙型肝炎治愈的最新共识中提出了乙型肝炎的三个治愈:(1)完全治愈(complete sterilizing cure 或 absolute cure);(2)功能性治愈(functional cure);(3)部分治愈(partial cure)。乙型肝炎完全治愈指血清中 HBsAg 消失,感染细胞内的 HBV DNA 彻底清除;功能性治愈指在一段时间治疗完成后持续检测不到血清 HBV DNA 和 HBsAg 伴或不伴 HBsAg 血清学转换,且遗留的肝损伤得到修复,肝细胞癌(HCC)发生风险降低;部分治愈指一段时间治疗完成后血清中可检测到 HBsAg,HBV DNA 持续低于检测值下限。

目前的治疗水平几乎不能达到乙型肝炎完全治愈^[2]。核苷(酸)类似物(NAs)长期抗病毒治疗理想的停药终点是 HBsAg 消失伴或不伴血清学转换^[3],但因为 HBsAg 既可由 HBV 共价闭合环状 DNA(cccDNA)转录表达,又可由 HBV 整合 DNA 转录表达^[4],患者经过长期抗病毒治疗,血清 HBsAg 消失可能需要中位数为 36~52.2 年的时间^[5],且存在治疗终

止后复发风险^[6]。因此 HBV 前基因组 RNA(pregenomic RNA, pgRNA)作为一种新型的反映肝内 HBV cccDNA 转录活性的血清标志物在慢性乙型肝炎(CHB)治疗过程病情进展方面具有重要的临床意义。

1 HBV pgRNA 是一种新型 HBV 血清学标志物

HBV pgRNA 是 HBV 复制的中间产物。在宿主感染细胞胞质中,HBV 核心颗粒包含的松弛环状 DNA(relaxed-circular DNA, rcDNA)经过补充正链,负链 5' 端结合 HBV 聚合酶以及移除正链 DNA 合成使用的短 RNA 引物,最后形成 HBV cccDNA,与组蛋白形成游离的微型染色体结构^[7]。HBV cccDNA 利用宿主感染肝细胞的转录系统产生所有的 HBV RNA,最长的转录产物 HBV pgRNA 大约有 3.5 kb,翻译形成 HBcAg 和 HBV 聚合酶^[8]。

有研究^[9]表明 HBV 衣壳蛋白的羧基末端结构域磷酸化与 HBV pgRNA 的相互作用对于 HBV pgRNA 逆转录以及不成熟 HBV 核心颗粒的组装有影响。其中,HBV 核心颗粒组装的开始依赖于病毒聚合酶对 HBV pgRNA 上 5' 端茎环结构的 RNA 序列(ϵ)的特殊识别和结合作用。在核心颗粒中,病毒聚合酶与 ϵ 序列结合形成核糖核蛋白复合物抑制 HBV pgRNA 翻译^[10],病毒衣壳包裹的单链 HBV pgRNA 逆转录为完整长度的 HBV 负链 DNA 并共价附着在病毒聚合酶逆转录酶结构域的引物结合区,同时,RNA 模板被病毒聚合酶的核糖核酸酶功能

doi:10.3969/j.issn.1001-5256.2018.10.035

收稿日期:2018-05-28;修回日期:2018-06-12。

基金项目:传染病国家科技重大专项(2017ZX10302201-004-009);北京市科技计划项目(D161100002716003;D161100002716002;D171100003117005)

作者简介:谭宁(1994-),女,主要从事病毒性肝炎的基础与临床研究。

通信作者:徐小元,电子邮箱:xiaoyuanxu6@163.com。

域消化,随后产生不完整的正链 DNA 形成 HBV rcDNA^[9]。这些包含 rcDNA 的成熟 HBV 核心颗粒可以被转运到细胞核继续形成 HBV cccDNA 分子,或者通过内质网分泌^[7]。CHB 患者血清中存在包含 HBV pgRNA 的 HBV 病毒颗粒,其中尤其是存在于受到 NAs 治疗的患者血清中,这大概是因为 NAs 抑制 HBV pgRNA 逆转录导致衣壳化 HBV pgRNA 的积累^[11-12]。因此,血清 HBV pgRNA 阳性在检测不到 HBV DNA 的 NAs 治疗患者中可以提示 HBV cccDNA 转录活动以及作为停药后 CHB 复发的预测因素。

之前已有研究^[12]表明,血清 HBV pgRNA 水平可以作为新的血清学标志物来预测 HBeAg 阳性患者在抗病毒治疗过程中的血清学应答。抗病毒治疗时 HBV pgRNA 的动态变化与发生 HBeAg 血清学转换的可能性有强相关。发生 HBeAg 血清学转换的 HBeAg 阳性 HBV 慢性感染者的 HBV RNA 水平下降显著,与该研究中所有 HBeAg 阴性患者变化相似。此外,关于 HBV pgRNA 在 HCC 分类及预后中的研究提示,来源于非整合完整 HBV 基因组的 HBV pgRNA 是反映病毒复制活动以及判断 CHB 预后的敏感血清学标志物^[13]。

2 HBV pgRNA 可以反映 HBV cccDNA 的转录活动

大量研究^[14-16]表明,每个感染肝细胞内存在 5~50 拷贝 HBV cccDNA,作为 HBV pgRNA 的原始模板,其存在对 HBV 复制以及感染状态的形成十分重要。理论上说,感染的肝细胞内只要有一个保留有复制能力的 HBV cccDNA 存在,抗病毒治疗停止后就可能有复发风险,有研究^[17]提出以 HBV cccDNA 消失或静默为基础,以 HBV RNA 持续阴性和低 HBsAg 水平为判定标准的“准临床治愈”,可以作为新的乙型肝炎治疗的阶段终点,可能在指导新型抗病毒药物研究,安全停药等方面具有重要意义。因此,感染细胞内 HBV cccDNA 的转录活动监测十分重要,然而肝内 HBV cccDNA 检测依赖于肝活组织检查,侵入性检查带来的损伤、标本合格率低、不同观察者间的主观性以及潜在的肝穿刺并发症阻碍了肝活组织检查的广泛应用。

有研究^[11]提示 HBV RNA 可以以衣壳化 HBV pgRNA 的病毒颗粒形式释放入血,与肝内 HBV cccDNA 的活动有强相关性。相关研究^[18]报道肝内 HBV pgRNA 和 HBV cccDNA 表达水平可以提示病毒持续存在和复制活性,该研究提示隐匿性 HBV 感染者 HBV pgRNA 和 HBV cccDNA 表达水平明显比 HBsAg 阳性患者低,因此,检测到肝内 HBV cccDNA 和 HBV pgRNA 可以提示存在 HBV 复制活动。还有研究^[19]表明,HBV RNA 对经拉米夫定或恩替卡韦治疗的慢性 HBV 感染者早期 YMDD 突变的发生有预测价值,这提示高水平 HBV RNA 可能是 HBV cccDNA 的活性转录形式以及发生 HBV RNA 肝内组装的标志物。

此外,关于血清 HBV RNA 与其他病毒血清学标志物在不同 CHB 疾病进程中的相关性的研究^[20]表明,血清 HBV RNA、HBV DNA 在 HBeAg 阳性 HBV 感染阶段最高,此时,HBV cccDNA 保持相对稳定。血清 HBV RNA 水平与血清 HBV

DNA、HBsAg 以及肝内 HBV cccDNA 水平在 HBeAg 阳性 HBV 感染者中呈正相关,且总的血清 HBV 核酸(包括 HBV DNA 和 HBV RNA)更能反映肝内 HBV cccDNA 转录活性,提示 HBV pgRNA 在反映 CHB 疾病进程中具有指导意义。

3 HBV pgRNA 与乙型肝炎核心相关抗原 (hepatitis B core-related antigen, HBcrAg) 具有较好的相关性

HBcrAg 由前 C 基因和 C 基因编码的三种蛋白组成: HBcAg、HBeAg、p22cr,这三种蛋白共同拥有一段 149 个氨基酸的氨基酸序列^[21]。近来,HBcrAg 被认为是一个 HBV 感染的新型血清学标志物,在涉及亚洲 CHB 患者的研究中,高水平的血清 HBcrAg 是发生 HCC 的独立危险因素。一个主要是 A 型和 D 型的 HBV 感染者的欧洲队列研究^[22]显示,在不同 HBV 感染阶段的 HBcrAg 水平有明显变化。有研究^[23]表明 HBcrAg 与血清 HBV DNA、肝内总 HBV DNA、HBV cccDNA 相关性良好。

HBcrAg 可以预测 HBeAg 阴性患者长期 HCC 风险,也可以用来监测 NAs 的治疗效果和停药复发的风险^[24]。血清 HBcrAg 阳性是 HBsAg 阴性、抗-HBc 阳性患者在高免疫抑制治疗过程中 HBV 再激活的重要危险因素,对区分出 NAs 预防性治疗最受益的患者有潜在意义^[21]。血清 HBcrAg 定量在 CHB 自然病程中不仅与肝内 HBV cccDNA 有正相关,而且这种相关性比血清 HBsAg 定量相比更具优越性^[25]。日本研究^[26]分析接受 NAs 治疗的 HBcrAg 阴性患者和 HBcrAg 阳性患者肝内的 HBV cccDNA、HBV DNA 以及 HBV RNA 水平,HBcrAg 阳性患者的 pgRNA、pre-S/S RNA 以及 HBX RNA 的水平明显更高,与肝内 HBV DNA 水平一致。HBcrAg 阳性患者肝内 HBV cccDNA 的转录活动活跃,存在更多的 HBV DNA 复制,这提示了 HBV pgRNA 与 HBcrAg 具有较好的相关性。与 HBcrAg 相比,HBV pgRNA 是 HBV cccDNA 的直接转录产物,可以更灵敏的反映 HBV 感染完全应答时 HBV cccDNA 的转录活动^[27]。

4 展望

除外 HBV cccDNA,HBV 整合入宿主基因组的整合 DNA 也具有转录活性,HBV DNA 整合在感染早期就可能发生^[28],只有 HBV cccDNA 可以作为全部四种具有 mRNA 功能的 HBV RNA 的转录模板^[6]。然而感染细胞内 HBV cccDNA 的存在并不意味着病毒具有复制活性,HBV pgRNA 来源于非整合的完整 HBV 基因组,是病毒复制和预后的敏感性血清标志物^[13]。因此,血清 HBV pgRNA 在预测 CHB 患者抗病毒治疗效果、乙型肝炎完全应答、以 HBV cccDNA 转录活动水平定义未来治疗概念等方面有重要意义。

研究表明 HBV pgRNA 在感染细胞中可以作为双链 DNA 断裂修复的模板,该途径也可能导致 HBV 基因序列插入宿主基因组。同时,因为 HBV DNA 聚合酶(带有逆转录功能)与病毒颗粒一起传递,HBV pgRNA 可以转变为 cDNA 存在于细胞中,提供 HBV DNA 整合的模板^[29]。HBV pgRNA 水平能否反映 HBV 整合 DNA 的活动状态需要进一步研究。

参考文献:

- [1] LOK AS, ZOULIM F, DUSHEIKO G, et al. Hepatitis B cure: From discovery to regulatory approval[J]. *J Hepatol*, 2017, 67(4): 847–861.
- [2] YANG HC, CHEN PJ. The potential and challenges of CRISPR – Cas in eradication of hepatitis B virus covalently closed circular DNA[J]. *Virus Res*, 2018, 244: 304–310.
- [3] 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.
- [4] KESHVARI M, SALI S, SHARAFI H, et al. P0594: Can serum level of hepatitis B surface antigen (HBsAg) differentiate HBsAg inactive carrier state from chronic hepatitis B? [J]. *J Hepatol*, 2015, 62: s539.
- [5] HONER ZU SIEDERDISSEN C, MAASOUMY B, CORNBERG M. What is new on HBsAg and other diagnostic markers in HBV infection? [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2017, 31(3): 281–289.
- [6] ZEISEL MB, LUCIFORA J, MASON WS, et al. Towards an HBV cure: state – of – the – art and unresolved questions – –report of the ANRS workshop on HBV cure [J]. *Gut*, 2015, 64(8): 1314–1326.
- [7] URBAN S, SCHULZE A, DANDRI M, et al. The replication cycle of hepatitis B virus[J]. *J Hepatol*, 2010, 52(2): 282–284.
- [8] SUN S, NAKASHIMA K, ITO M, et al. Involvement of PUF60 in transcriptional and post – transcriptional regulation of hepatitis B virus pregenomic RNA expression [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 12874.
- [9] WANG JC, DHASON MS, ZLOTNICK A. Structural organization of pregenomic RNA and the carboxy – terminal domain of the capsid protein of hepatitis B virus [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(9): e1002919.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] HALGAND B, DESTERKE C, RIVIERE L, et al. Hepatitis B virus pregenomic RNA in hepatocellular carcinoma: A nosological and prognostic determinant [J]. *Hepatology*, 2018, 67(1): 86–96.
- [14] NASSAL M. HBV cccDNA: Viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B [J]. *Gut*, 2015, 64(12): 1972–1984.
- [15] JUNG KS, PARK JY, CHON YE, et al. Clinical outcomes and predictors for relapse after cessation of oral antiviral treatment in chronic hepatitis B patients [J]. *J Gastroenterol*, 2016, 51(8): 830–839.
- [16] MATSUZAKI T, TATSUKI I, OTANI M, et al. Significance of hepatitis B virus core – related antigen and covalently closed circular DNA levels as markers of hepatitis B virus re – infection after liver transplantation [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28(7): 1217–1222.
- [17] LU FM, WANG J, CHEN XM, et al. The potential use of serum HBV RNA to guide the functional cure of chronic hepatitis B [J]. *Chin J Hepatol*, 2017, 25(2): 105–110. (in Chinese)
- [18] BAI F, YANO Y, FUKUMOTO T, et al. Quantification of pregenomic RNA and covalently closed circular DNA in hepatitis B virus – related hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Hepatol*, 2013, 2013: 849290.
- [19] 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.
- [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 – naive HBV – infected individuals [J]. *J Clin Virol*, 2018, 99–100: 71–78.
- [21] SETO WK, WONG DK, CHAN TS, et al. Association of hepatitis B core – related antigen with hepatitis B virus reactivation in occult viral carriers undergoing high – risk immunosuppressive therapy [J]. *Am J Gastroenterol*, 2016, 111(12): 1788–1795.
- [22] MAASOUMY B, WIEGAND SB, JAROSZEWICZ J, et al. Hepatitis B core – related antigen (HBcrAg) levels in the natural history of hepatitis B virus infection in a large European cohort predominantly infected with genotypes A and D [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2015, 21(6): 606 e1–10.
- [23] SETO WK, TANAKA Y, WONG DK, et al. Evidence of serologic activity in chronic hepatitis B after surface antigen (HBsAg) seroclearance documented by conventional HBsAg assay [J]. *Hepatol Int*, 2012, 7(1): 98–105.
- [24] LUCKENBAUGH L, KITRINOS KM, DELANEY WET, et al. Genome – free hepatitis B virion levels in patient sera as a potential marker to monitor response to antiviral therapy [J]. *J Viral Hepat*, 2015, 22(6): 561–570.
- [25] CHEN EQ, FENG S, WANG ML, et al. Serum hepatitis B core – related antigen is a satisfactory surrogate marker of intrahepatic covalently closed circular DNA in chronic hepatitis B [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 173.
- [26] HONDA M, SHIRASAKI T, TERASHIMA T, et al. Hepatitis B virus (HBV) core – related antigen during nucleos(t)ide analog therapy is related to intra – hepatic HBV replication and development of hepatocellular carcinoma [J]. *J Infect Dis*, 2016, 213(7): 1096–1106.
- [27] LIU RX, PAN XC, GENG J. Clinical value of serum HBV RNA [J]. *J Clin Hepatol*, 2017, 33(11): 2196–2199. (in Chinese)
- [28] 刘瑞霞, 潘修成, 耿建. 血清 HBV RNA 检测的临床价值 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2017, 33(11): 2196–2199.
- [29] TU T, BUDZINSKA MA, VONDRAN FWR, et al. Hepatitis B virus DNA integration occurs early in the viral life cycle in an in vitro infection model via NTCP – dependent uptake of enveloped virus particles [J]. *J Virol*, 2018, 92(12): e02007–e02017.
- [29] ARZUMANYAN A, REIS HM, FEITELSON MA. Pathogenic mechanisms in HBV – and HCV – associated hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(2): 123–135.

引证本文: TAN N, LUO H, XU XY. Significance of hepatitis B virus pregenomic RNA in the progression of chronic hepatitis B [J]. *J Clin Hepatol*, 2018, 34(10): 2221–2223. (in Chinese)

谭宁, 罗皓, 徐小元. HBV pgRNA 在慢性乙型肝炎进程中的可能意义 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2018, 34(10): 2221–2223.

(本文编辑: 朱 晶)