

乙型肝炎病毒核酸检测在抗病毒治疗中的应用价值

杨志 潘飞燕

作者单位: 318000 浙江台州, 浙江省台州医院中心实验室

通信作者: 杨志, Email: yangz9993@enzemed.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2021.01.020

【摘要】 乙型肝炎(乙肝)病毒(HBV)感染是导致乙肝肝硬化和原发性肝细胞癌(HCC)发生的主要因素之一。目前临床上使用抗病毒药物抑制 HBV 的复制,但抗病毒药物耐药性的发生很难被及时发现,因此 HBV 核酸检测(NAT)作为预测 HBV 耐药性发生的主要手段,在慢性乙肝患者诊断及抗病毒治疗的应用中不可或缺。本文从乙肝 DNA 定量检测、HBV 基因 P 区检测和基因分型、微小 RNA(miRNA)检测等方面进行综述,分析 NAT 在 HBV 耐药性诊断以及 HCC 癌变检测中的应用,讨论 NAT 对减少乙肝抗病毒药物耐药性和降低 HCC 在慢性乙肝患者中的发病率的价值。

【关键词】 乙型肝炎病毒; 核酸检测技术; 隐匿性乙型肝炎病毒感染; 基因分型; DNA 定量

Application value of hepatitis B virus nucleic acid testing in antiviral therapy

Yang Zhi, Pan Feiyan. Central Laboratory, Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Taizhou 318000, Zhejiang, China

Corresponding author: Yang Zhi, Email: yangz9993@enzemed.com

【Abstract】 Hepatitis B virus (HBV) infection was one of the main factors leading to hepatitis B cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). At present, antiviral drugs were used to inhibit the replication of HBV in clinic. However, it was difficult to detect the occurrence of antiviral drug resistance. Therefore, HBV nucleic acid testing (NAT), as the main means for the prediction of HBV resistance, was indispensable method in the diagnosis and application of antiviral therapy in patients with chronic hepatitis B. This article reviewed the quantitative detection of hepatitis B DNA, detection of HBV gene P region and genotyping, and microRNA (miRNA) detection. It also analyzed the application of NAT technology in the diagnosis of HBV resistance and detection of HCC carcinogenesis, and discusses the value of this technology in decreasing the resistance of HBV and reducing the incidence of HCC in chronic hepatitis B patients.

【Key words】 Hepatitis B virus; Nucleic acid testing; Occult hepatitis B virus infection; Genotyping; DNA quantification

据统计,全球共有慢性乙型肝炎(乙肝)患者超过 2.4 亿,每年因感染乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)导致严重肝脏疾病〔包括乙肝肝硬化和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)〕而死亡的人数超过 88 万^[1]。目前临床上常使用干扰素和核酸或核苷酸类似物进行乙肝抗病毒治疗,而抗病毒药物耐药的发生是影响疗效的主要原因^[2]。其中运用核酸检测技术(nucleic acid testing, NAT)对 HBV 抗性的产生进行及时有效的判断是乙肝抗病毒治疗的难点。目前,研究人员已经发现多个基因突变位点, NAT 可为临床抗乙肝病毒药物耐药的检测提供重要指标。本文从乙肝三系结合乙肝 DNA 定量检测、隐匿性 HBV 感染(occult hepatitis B virus infection, OBI)的 DNA 检测、HBV 基因 P 区检测与基因分型检测和微小 RNA (microRNA, miRNA) 检测对慢性乙肝患者发生乙肝肝硬化和 HCC 的影响等方面综述了

乙肝抗病毒治疗和临床检测的研究进展。

1 乙肝 DNA 定量

1.1 乙肝三系检测 近年来乙肝表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)的定量检测在监测慢性乙肝患者体内 HBV 免疫情况和干扰素个体化治疗中的应用越来越受到重视^[3]。临床医生逐渐认识到联合检测携带高浓度 HBsAg HBV 感染者的甲胎蛋白水平对观察肝脏损害的演变过程具有重要价值^[4-5]。同时, HBsAg 定量有助于区分乙肝 e 抗原阳性患者的免疫耐受期和免疫清除期,在决定对免疫无反应性乙肝患者干扰素的早期终止治疗时起关键作用,但仍不能很好地评估 HBV 在人体内的复制情况。判断 HBV 的再活跃期并阻断其在体内的复制是实现乙肝功能性治愈的前提。使用核酸类似物进行抗病毒治疗的乙肝患者体内 HBsAg 的表达水平下降到极低水平,伴随 HBsAg 的血清学清除。对于一部

分 HBV 携带者,其 HBsAg 表达水平极低甚至检测为阴性^[6-7],当发生抗病毒耐药时,乙肝三系检测并不能及时发现和判断。

1.2 实时乙肝 DNA 定量 研究表明,1~5 岁儿童感染 HBV 后会转为慢性肝炎,但成年人感染 HBV 后仅有部分转为慢性。机体免疫耐受状态与 HBV 持续感染及慢性化相关。HBV 感染患者抗病毒治疗期间,1 个月内 HBV 从较低浓度升高 10 倍就可认为对药物产生了抗性^[8-9]。因此,实时动态的乙肝 DNA 定量监测有助于分析体内 HBV 的复制情况。

在 HBsAg 阴性的受试者中,OBI 的患病率很高,并且与抗-HBc 阳性相关^[10]。传统的乙肝三系检测在 OBI 的筛查中存在一定的漏检风险,而通过 NAT 能检测到低复制表达水平的 DNA,进行实时动态监测,从而有助于提高对 OBI 的筛查力度。

1.3 共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA) 检测 法国圣安东尼大学医院对就诊的 3 966 例患者进行乙肝三系和乙肝 DNA 检测,结果显示 OBI 发生率为 1.19% (47/3 966)^[11],OBI 的再激活会导致发生急性重型肝炎的可能性升高。OBI 患者体内的 HBV 浓度升高,因此患 HCC 的风险也将明显升高。Caviglia 等^[12]和 Dong 等^[13]研究表明,大约有 52% 的 HBV cccDNA 可被检测出来,乙肝患者抗病毒治疗抗药性发生率与体内 HBV 的 DNA 浓度有关,而肝硬化及 HCC 的严重程度又与 HBV DNA 的长期高浓度感染状态有直接关系。cccDNA 在细胞核中的持续存在可导致乙肝复发,使彻底治愈慢性乙肝变得异常艰难^[14-15]。因此 NAT 对于 OBI 的 DNA 定量实时动态监测以及 OBI 患者的早期抗病毒治疗是一种有效方法。

2 HBV 基因 P 区检测

采用荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 结合 DNA 测序技术对患者进行 HBV 基因 P 区耐药突变点检测分析是近年来常用的抗病毒耐药分析手段。HBV 基因 P 区主要编码 HBV 逆转录酶,在未使用核酸或核苷酸类似物治疗的乙肝患者中,HBV 野生型为优势病毒株,当使用拉米夫定作为抗病毒药物时,在药物的选择压力下,HBV 基因 P 区位点发生自然突变的耐药病毒株在人群中广泛存在,逐渐形成优势病毒株。HBV 基因 P 区序列测序正是基于对病毒逆转录酶的编码区进行分析,及时发现酶编码序列的变化,从而动态监测逆转录酶的活性和功能转变。有研究显示,替诺福韦酯

和富马酸丙酚替诺福韦作为慢性乙肝新一代抗病毒药物,显示出了更好的抗病毒效果和安全性^[16-17]。在乙肝 DNA 拷贝数突破病毒学浓度前及时换药干预,能为耐药抗性的产生判断提供比较准确的依据。

HBV 基因 P 区测序等方法需要改进,以提高检测的敏感度。目前 rtV173、rtL180、rtM204 为突变频率较高的位点,对 HBV 基因 P 区测序显示出较高的检测价值。但是通过不同方法对 HBV 耐药性检测的数据进行比较和整合目前仍有一定困难,另外肝靶向抗 HBV 单链寡核苷酸与锁定核酸联合应用可显著降低患者体内的 HBV 基因表达^[18]。在恩替卡韦治疗失败的情况下,以替诺福韦酯和富马酸丙酚替诺福韦为代表的新一代药物可有效抗病毒。

3 HBV 基因分型

HBV 耐药性可以通过基因分型和表型分析进行检测。HBV 基因分型依赖于基因测序和杂交技术。由于测序方法包括 PCR 产物的克隆和限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 的分析^[19-20]。DNA 测序一般无法检测新出现的药物抗性片段,因此少量突变很难检测出来,而克隆测序能解决这一问题。病毒中只要有 5% 以上的突变个体出现,就可通过 RFLP 分析和判断突变的发生。但此方法必须对每个突变位点进行引物设计,且需要有一定技术的人员操作并对可能的位点进行覆盖检测,因此仅适合在实验室进行,大规模临床应用并不实际。目前通过 HBV 基因 P 区测序可以较快速地对 HBV 进行基因分型。其他基于杂交的检测方法包括电脑辅助的微阵列分析、荧光分析和鸟苷酸氧化法的电化学方法,但这些方法有一定缺陷:① 仪器的使用成本较高,且需要能够熟练使用仪器的专业人员进行检测及结果分析;② 目前对检测结果的准确性和判断标准缺乏数据支持,因此限制了这些方法在临床上的大规模应用。目前新一代抗病毒药物替诺福韦的抗药性已经出现,但作用机制尚不明确,因此测序分析已成为一种潜在的检测耐药发生相关位点的有效手段^[21-22]。

4 微小 RNA (microRNA, miRNA) 检测

有研究表明,HBV 编码的 miRNA 能够调控宿主基因的表达。HBV-miR-3 可通过多种途径激活固有免疫反应,抑制 HBV 复制,从而减小 HBV 诱导的急性肝细胞损伤,影响 HBV 持续感染的进程。同时 HBV-miR-3 能抑制蛋白磷酸酶 1A (protein phosphatase 1A, PPM1A) 的翻译过程来使其沉默,PPM1A 的下调

促进了与 HCC 发展相关的细胞增殖^[23-24]。临床危险因素分析显示,肝癌和肝硬化患者的 miRNA 表达存在差异,其中 miRNA-210-3p、miRNA-223-3p^[25-26]在 HBV 相关性 HCC 中具有重要作用。血清 miRNA 谱可作为 HBV 阳性的 HCC 诊断标志物^[27-28],为 HCC 诊断提供了新的方向。因此,研究人员通过优化 miRNA 定量检测应用,可以提高对 HCC 的诊断和监测^[28]。对于 HBV 感染导致的肝硬化甚至 HCC, miRNA 的核酸检测或可成为新的有效评价指标,用于检测 HBV 的抗病毒治疗效果。

5 结语与展望

总体而言,使用 NAT 分析慢性乙肝患者及 HBV 携带者体内的 HBV DNA 复制情况,能够及时有效地进行抗病毒治疗和预后评估,并控制患者的病毒浓度。由于抗病毒药物发生耐药是导致治疗失败最主要的因素之一,HBV NAT 结合传统的乙肝三系检测手段能够为乙肝患者的抗病毒治疗提供诊断依据,是预防和控制 HBV 复制的关键。这对于减少 HCC 在慢性乙肝患者中的发生起到积极的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- STOCKDALE A J, KREUELS B, HENRION M Y R, et al. The global prevalence of hepatitis D virus infection: systematic review and meta-analysis [J]. *J Hepatol*, 2020, 73 (3): 523-532. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.04.008.
- 覃彦平,柯柳华,蒋义生,等. 回顾性分析慢性乙型肝炎患者血清 HBsAg 与 HBV DNA 水平的关联性 [J]. *实用检验医师杂志*, 2014, 6 (3): 164-167. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2014.03.009.
- 苗静,袁晨翼,李秋伟,等. 慢性乙型肝炎病毒感染患者外周血 CD4⁺、CD8⁺T 细胞的表达与 HBsAg 定量的相关性分析 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2016, 23 (4): 399-403. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.04.015.
- CORNBERG M, WONG V W, LOCARNINI S, et al. The role of quantitative hepatitis B surface antigen revisited [J]. *J Hepatol*, 2017, 66 (2): 398-411. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.08.009.
- 苗静,吴素琼,郭丽颖,等. 甲胎蛋白和胆碱酯酶在乙型肝炎病毒相关慢急性肝衰竭患者中应用价值的研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2016, 28 (3): 257-261. DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2016.03.013.
- 徐群芳. 乙型肝炎不同 HBsAg 浓度与血清人宫颈癌基因蛋白、甲胎蛋白水平的变化及其相关性 [J]. *实用检验医师杂志*, 2017, 9 (4): 193-197. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2017.04.001.
- YIP T C, WONG G L. Current knowledge of occult hepatitis B infection and clinical implications [J]. *Semin Liver Dis*, 2019, 39 (2): 249-260. DOI: 10.1055/s-0039-1678728.
- 周培,渠淑云. 慢性 HBV 感染免疫耐受期研究现状 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2020, 30 (5): 477-480, 后插 5. DOI: 10.3969/j.issn.1005-0264.2020.05.032.
- INOUE T, TANAKA Y. Novel biomarkers for the management of chronic hepatitis B [J]. *Clin Mol Hepatol*, 2020, 26 (3): 261-279. DOI: 10.3350/cmh.2020.0032.
- PISATURO M, ONORATO L, RUSSO A, et al. An estimation of the prevalence of occult HBV infection in Western Europe and in Northern America: a meta-analysis [J]. *J Viral Hepat*, 2020, 27 (4): 415-427. DOI: 10.1111/jvh.13248.
- MALAGNINO V, FOFANA D B, LACOMBE K, et al. Occult hepatitis

- B virus infection: an old entity with novel clinical involvements [J]. *Open Forum Infect Dis*, 2018, 5 (10): ofy227. DOI: 10.1093/ofid/ofy227.
- CAVIGLIA G P, ABATE M L, TANDOI F, et al. Quantitation of HBV cccDNA in anti-HBc-positive liver donors by droplet digital PCR: a new tool to detect occult infection [J]. *J Hepatol*, 2018, 69 (2): 301-307. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.03.021.
- DONG J, YING J, QIU X, et al. Advanced strategies for eliminating the cccDNA of HBV [J]. *Dig Dis Sci*, 2018, 63 (1): 7-15. DOI: 10.1007/s10620-017-4842-1.
- WANG J, ZHANG P, ZENG J, et al. Occurrence of occult hepatitis B virus infection associated with envelope protein mutations according to anti-HBs carriage in blood donors [J]. *Int J Infect Dis*, 2020, 92: 38-45. DOI: 10.1016/j.ijid.2019.12.026.
- INDRASETIWAN P, AOKI-UTSUBO C, HANAFI M, et al. Antiviral activity of *Cananga odorata* against hepatitis B virus [J]. *Kobe J Med Sci*, 2019, 65 (2): E71-E79.
- JAVANBAKHT H, MUELLER H, WALTHER J, et al. Liver-targeted anti-HBV single-stranded oligonucleotides with locked nucleic acid potentially reduce HBV gene expression *in vivo* [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 11: 441-454. DOI: 10.1016/j.omtn.2018.02.005.
- BAZINET M, PÂNTEA V, PLACINTA G, et al. Safety and efficacy of 48 weeks REP 2139 or REP 2165, tenofovir disoproxil, and pegylated interferon Alfa-2a in patients with chronic HBV infection naïve to nucleos(t)ide therapy [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158 (8): 2180-2194. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.02.058.
- LAU K C, OSIOWY C, COFFIN C S. Hepatitis B virus (HBV) genome detection and genotyping in virally suppressed patients using nested polymerase chain reaction-based Sanger sequencing [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2019, 93 (4): 318-324. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.10.015.
- YAO L, LU J, QU M, et al. Methodology and application of PCR-RFLP for species identification in tuna sashimi [J]. *Food Sci Nutr*, 2020, 8 (7): 3138-3146. DOI: 10.1002/fsn3.1552.
- FATTAHI S, KARIMI ALIWIJE M, BABAMAHOODI F, et al. Cytochrome P450 genes (CYP2E1 and CYP1A1) variants and susceptibility to chronic hepatitis B virus infection [J]. *Indian J Clin Biochem*, 2018, 33 (4): 467-472. DOI: 10.1007/s12291-017-0698-6.
- ZHANG X, CHEN X, WEI M, et al. Potential resistant mutations within HBV reverse transcriptase sequences in nucleos(t)ide analogues-experienced patients with hepatitis B virus infection [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 8078. DOI: 10.1038/s41598-019-44604-6.
- ZHAO X, SUN L, MU T, et al. An HBV-encoded miRNA activates innate immunity to restrict HBV replication [J]. *J Mol Cell Biol*, 2020, 12 (4): 263-276. DOI: 10.1093/jmcb/mjz104.
- YANG X, LI H, SUN H, et al. Hepatitis B virus-encoded microRNA controls viral replication [J]. *J Virol*, 2017, 91 (10): e01919-16. DOI: 10.1128/JVI.01919-16.
- CHAVALIT T, NIMSAMER P, SIRIVASSANAMETHA K, et al. Hepatitis B virus-encoded microRNA (HBV-miR-3) regulates host gene PPM1A related to hepatocellular carcinoma [J]. *Microna*, 2020, 9 (3): 232-239. DOI: 10.2174/2211536608666191104105334.
- PRATEDRAT P, CHUAYPEN N, NIMSAMER P, et al. Diagnostic and prognostic roles of circulating miRNA-223-3p in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma [J]. *PLoS One*, 2020, 15 (4): e0232211. DOI: 10.1371/journal.pone.0232211.
- ZHU H T, LIU R B, LIANG Y Y, et al. Serum microRNA profiles as diagnostic biomarkers for HBV-positive hepatocellular carcinoma [J]. *Liver Int*, 2017, 37 (6): 888-896. DOI: 10.1111/liv.13356.
- HAO Q Q, WANG Q H, XIA W, et al. Circulating miRNA expression profile and bioinformatics analysis in patients with occult hepatitis B virus infection [J]. *J Med Virol*, 2020, 92 (2): 191-200. DOI: 10.1002/jmv.25594.
- KUMAR A, ACHARYA S K, SINGH S P, et al. 2019 Update of Indian National Association for study of the liver consensus on prevention, diagnosis, and management of hepatocellular carcinoma in India: the Puri II recommendations [J]. *J Clin Exp Hepatol*, 2020, 10 (1): 43-80. DOI: 10.1016/j.jceh.2019.09.007.

(收稿日期: 2021-01-21)

(本文编辑: 邵文)