

慢性乙型肝炎患者接受核苷（酸）类似物治疗后发生低病毒血症的危险因素及机制研究

吕承秀^{a, c}, 陈梅^b, 王纪传^b, 李庆^{a, c}, 张琨婷^{a, c}, 孙晓琳^{a, c}

(淄博市第一医院 a. 检验科; b. 感染性疾病科; c. 分子免疫检验医学重点实验室, 山东淄博 255200)

摘要: **目的** 研究慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 患者接受核苷 (酸) 类似物 [nucleos(t)ide analogues, NAs] 治疗下发生低病毒血症 (low-level viremia, LLV) 的危险因素及机制。**方法** 选取 2021 年 5 月 ~ 2023 年 3 月淄博市第一医院感染科门诊就诊的 NAs 治疗疗程大于 48 周且高敏 HBV DNA < 2 000 IU/ml 的 115 例 CHB 患者, 根据高敏 HBV DNA 定量结果分为持续性 LLV 组 ($n=34$)、间歇性 LLV 组 ($n=32$) 及持续病毒学应答 (sustained virologic response, SVR) 组 ($n=49$); 收集患者 NAs 治疗前临床特征及实验室指标进行组间比较, 采用 Logistic 回归分析确定 LLV 发生的危险因素; 抽取患者 NAs 治疗后血清进行肝功能指标、乙型肝炎病毒双链松弛环状 DNA (hepatitis B virus double-strand relaxed circular DNA, HBV rcDNA) 及前基因组 RNA (pregenomic RNA, pgRNA) 检测并进行结果的组间比较, 探讨 LLV 发生的机制。**结果** 持续性 LLV 组、间歇性 LLV 组及 SVR 组乙型肝炎 e 抗原 (hepatitis B e antigen, HBeAg) 阳性率分别为 70.59%, 53.13% 和 10.20%, 乙型肝炎表面抗原 (hepatitis B surface antigen, HBsAg) (lgIU/ml) 结果分别为 3.27(3.03, 3.61), 3.04(2.93, 3.26) 和 2.99(2.20, 3.16)。间歇性 LLV 组和持续性 LLV 组 HBeAg 阳性率均高于 SVR 组 ($\chi^2=14.005$, 27.192, 均 $P<0.001$), 持续性 LLV 组 HBsAg 结果高于 SVR 组 ($Z=-3.375$, $P=0.001$), 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。Logistic 回归分析发现, 患者治疗前 HBeAg 阳性 (OR: 8.660, 95%CI: 2.865 ~ 26.183) 是患者发生 LLV 的独立危险因素。持续性 LLV 组、间歇性 LLV 组及 SVR 组 HBV rcDNA 的阳性率分别为 58.82%, 6.25% 和 0.00%, pgRNA 阳性率分别为 52.94%, 18.75% 和 4.08%。持续性 LLV 组 HBV rcDNA 阳性率高于 SVR 组和间歇性 LLV 组 ($\chi^2=20.504$, 37.974, 均 $P<0.001$), 持续性 LLV 组 pgRNA 阳性率高于间歇性 LLV 组和 SVR 组 ($\chi^2=8.328$, 26.199; $P=0.005$, <0.001), 差异均有统计学意义。**结论** CHB 患者 NAs 治疗前 HBeAg 阳性是发生 LLV 的独立危险因素; NAs 治疗后部分 LLV 患者 HBV pgRNA 阳性且定量水平高, HBV rcDNA 维持在较高的合成水平, NAs 无法完成抑制 rcDNA 的合成, 从而导致 LLV 的发生。

关键词: 慢性乙型肝炎; 低病毒血症; 双链松弛环状脱氧核糖核酸; 前基因组核糖核酸

中图分类号: R512.62; R446 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2023) 05-133-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2023.05.025

Risk Factors and Mechanism of Low-level Viremia in Patients with Chronic Hepatitis B Receiving Nucleos(t)ide Analogues Treatment

LÜ Chengxiu^{a, c}, CHEN Mei^b, WANG Jichuan^b, LI Qing^{a, c}, ZHANG Kunting^{a, c}, SUN Xiaolin^{a, c}

(a. Department of Clinical Laboratory; b. Department of Infection Diseases; c. Key Laboratory of Molecular Immunology of Laboratory Medicine, Zibo First Hospital, Shangdong Zibo 255200, China)

Abstract: Objective To investigate the risk factors and mechanism of low-level viremia (LLV) in patients with chronic hepatitis B (CHB) who receive nucleos(t)ide analogues (NAs) treatment. **Methods** 115 CHB patients who received NAs treatment for more than 48 weeks and had HBV DNA < 2 000 IU/ml were selected from the Department of Infection Diseases of Zibo First Hospital from May 2021 to March 2023. Based on the results of high sensitivity HBV DNA quantification, patients were divided into persistent LLV group ($n=34$), intermittent LLV group ($n=32$), and sustained virologic response (SVR) group ($n=49$). Clinical characteristics and laboratory indicators of patients with NAs before treatment were collected for inter group comparison. Logistic regression analysis was used to determine the risk factors for LLV occurrence. The serum of patients under NAs treatment was extracted for liver function indicators, hepatitis B virus double-stranded relaxed circular DNA (HBV rcDNA) and pregenomic RNA (pgRNA) detection. The results were compared between groups to explore the mechanism of LLV occurrence.

基金项目: 淄博市第一医院院级课题 (2022YJKT-28): CHB 患者低病毒血症与 rcDNA 及 pgRNA 的相关性研究。

作者简介: 吕承秀 (1987-), 男, 硕士, 主管检验师, 研究方向: 病原体分子生物学检验, E-mail: lvchengxiu870901@126.com。

通讯作者: 孙晓琳 (1982-), 女, 硕士, 副主任技师, 研究方向: 病原微生物学, E-mail: zb_lab@163.com。

Results The HBeAg positive rates in the persistent LLV group, intermittent LLV group, and SVR group were 70.59%, 53.13% and 10.20%, respectively. The HBsAg (lgIU/ml) results were 3.27 (3.03, 3.61), 3.04 (2.93, 3.26) and 2.99 (2.20, 3.16), respectively. The HBeAg positive rates in the intermittent LLV group and the persistent LLV group were higher than those in the SVR group ($\chi^2=14.005$, 27.192, all $P<0.001$), and the HBsAg values in the persistent LLV group were higher than those in the SVR group ($Z=-3.375$, $P=0.001$) with statistical significance. Logistic regression analysis found that HBeAg positivity (OR: 8.660, 95%CI: 2.865~26.183) before treatment was an independent risk factor for the development of LLV in patients. The positive rates of HBV rcDNA in the persistent LLV group, intermittent LLV group, and SVR group were 58.82%, 6.25% and 0.00%, respectively. The positive rates of pgRNA were 52.94%, 18.75% and 4.08%, respectively. The positive rate of HBV rcDNA in the persistent LLV group was higher than that in the SVR group and intermittent LLV group ($\chi^2=20.504$, 37.974, all $P<0.001$), the positive rate of pgRNA in the persistent LLV group was higher than that in the intermittent LLV group and SVR group ($\chi^2=8.328$, 26.199; $P=0.005$, <0.001), the differences were statistically significant. **Conclusion** HBeAg positivity before NAs treatment in CHB patients is an independent risk factor for the development of LLV. Some patients under treatment with NAs with LLV had positive HBV pgRNA and high quantitative levels, the synthesis of HBV rcDNA was high level, NAs can not complete the inhibition of rcDNA synthesis, leading to the occurrence of LLV.

Keywords: chronic hepatitis B; low-level viremia; double-strand relaxed circular DNA; pregenomic RNA

慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 是由乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染引起的肝脏慢性炎症性疾病。CHB 患者接受核苷 (酸) 类似物 [nucleos(t)ide analogues, NAs] 抗病毒治疗可减轻肝脏炎症、逆转或延缓纤维化进程, 降低肝细胞癌的发生风险。近年来研究发现^[1], 尽管 CHB 患者长期接受 NAs 抗病毒治疗, 仍有约 30% 的患者发生低病毒血症 (low-level viremia, LLV)。SUN 等^[2-3] 研究发现 LLV 是 CHB 患者抗病毒治疗后患者纤维化进展及肝癌发生的重要危险因素。目前关于 LLV 发生的危险因素及机制尚不明确。本研究旨在分析 CHB 患者长期接受 NAs 治疗后发生 LLV 的危险因素, 探究 LLV 发生的机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2021 年 5 月 ~ 2023 年 3 月淄博市第一医院感染科门诊就诊的 115 例 CHB 患者。纳入标准: ①所有 CHB 患者符合《慢性乙型肝炎防治指南 (2022 版)》; ②患者经 NAs 治疗时间大于 48 周; ③高敏 HBV DNA 连续检测至少 2 次, 每次间隔至少 3 个月, 高敏 HBV DNA $<2\ 000\text{ IU/ml}$ 或阴性。排除标准: ①并发甲、丙、丁型肝炎病毒或其他嗜肝病毒感染; ②并发肝衰竭或急性乙型肝炎; ③并发恶性肿瘤; ④酒精、免疫或其他原因引发的肝脏损伤者; ⑤用药依从性差的患者。本研究获得医院伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂 SLAN 96P 全自动荧光定量 PCR 仪 (上海宏石医疗科技有限公司), EZ Bead 全自动核酸提取仪及高敏 HBV DNA 定量检测试剂盒 (山东见微生物科技有限公司), i2000SR 化学发光仪及乙型肝炎五项定量检测试剂盒 (美国雅培公司), AU5821 全自动生化分析仪及肝功能检测试剂盒 (美国贝克曼公司), 乙型肝炎病毒前基因组 RNA

(hepatitis B virus pregenomic RNA, HBV pgRNA) 定量检测试剂盒 (圣湘生物科技股份有限公司), 乙型肝炎病毒双链松弛环状 DNA (hepatitis B virus double-strand relaxed circular DNA, HBV rcDNA) 引物及荧光探针 (通用生物股份有限公司合成)。

1.3 方法

1.3.1 实验分组: 根据 CHB 患者 NAs 治疗后的高敏 HBV DNA 定量结果, 将患者分为持续 LLV 组、间歇 LLV 组和持续病毒学应答 (sustained virologic response, SVR) 组。持续 LLV 组定义为接受 NAs 治疗至少 48 周以后, 患者连续检测高敏 HBV DNA 至少 2 次, 每次间隔 3 ~ 6 个月, HBV DNA 均阳性, 但 $<2\ 000\text{ IU/ml}$; 间歇 LLV 组定义为接受 NAs 治疗至少 48 周以后, 患者连续检测高敏 HBV DNA 至少 3 次, 每次间隔 3 ~ 6 个月, HBV DNA 间歇阳性, 但 $<2\ 000\text{ IU/ml}$; SVR 组定义为接受 NAs 治疗至少 48 周以后, 患者连续检测高敏 HBV DNA 至少 2 次, 每次间隔 3 ~ 6 个月, HBV DNA 均阴性。

1.3.2 患者 NAs 治疗前临床特征及实验室指标: 医院信息化系统收集患者治疗前临床特征及实验室指标。实验室指标包括乙型肝炎 e 抗原 (hepatitis B e antigen, HBeAg)、乙型肝炎表面抗原 (hepatitis B surface antigen, HBsAg)、乙型肝炎核心抗体 (antibody to hepatitis B core antigen, HBcAb)、丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素 (total bilirubin, TBil)、 γ -谷氨酰转氨酶 (γ -glutamyl transpeptidase, GGT)、清蛋白 (albumin, Alb)、总胆汁酸 (total biliary acid, TBA) 和血小板计数 (platelet count, PLT)。

1.3.3 患者 NAs 治疗后肝功能、高敏 HBV DNA, HBV rcDNA 及 HBV pgRNA 检测: 抽取患者 NAs

治疗后全血,离心分离血清分别进行肝功能(ALT, AST, TBil, GGT, Alb, TBA)检测、高敏HBV DNA, HBV rcDNA 和 HBV pgRNA 检测。其中高敏HBV DNA 检测(检出限 10 IU/ml)采用 TaqMan 实时荧光定量法,HBV pgRNA 检测(检出限 50copies/ml)采用 TaqMan 实时荧光定量法,HBV rcDNA(检出限 20 IU/ml)采用 TaqMan 实时荧光法,HBV rcDNA 检测参见文献报道^[4]。

1.4 统计学分析 采用 SPSS23.0 进行数据统计处理,计数资料多组间比较用卡方(χ^2)检验,组间进一步两两比较采用 Bonferroni 检验;正态分布的计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用独立样本方差分析,组间进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验;非正态分布的计量资料用中位数(四分位间距)[M(P₂₅, P₇₅)]表示,多组间比较用 Kruskal-Wallis *H* 检验,组间进一步两两比较采用 Nemenyi 检验;多因素 Logistic 回归分析 CHB 患者 NAs 治疗后发生 LLV 的独立危险因素;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者 NAs 治疗后发生 LLV 的危险因素分析

2.1.1 患者 NAs 治疗后发生 LLV 的单因素分析:见表 1。本研究共纳入 CHB 患者 115 例,其中持

续性 LLV 组 34 例、间歇性 LLV 组 32 例和 SVR 组 49 例。持续性 LLV 组、间歇性 LLV 组及 SVR 组患者 NAs 治疗前的临床特征和实验室指标进行比较发现,三组间在年龄、性别构成、HBcAb 定量结果、肝功能指标及血小板计数之间差异均无统计学意义($\chi^2/F/Z=0.027, 5.386, 0.275, 0.406, 1.308, 2.442, 1.064, 0.030, 1.344, 1.151$, 均 *P*>0.05);HBcAg 阳性率在三组间的差异有统计学意义($\chi^2=33.678$, *P*<0.001),组间进一步两两比较发现,间歇性 LLV 组和持续性 LLV 组 HBcAg 阳性率均高于 SVR 组($\chi^2=14.005, 27.192$, 均 *P*<0.001);HBsAg(IgIU/ml)结果在三组间的差异有统计学意义($Z=12.314$, *P*=0.002),组间进一步两两比较发现,持续性 LLV 组 HBsAg(IgIU/ml)值高于 SVR 组($Z=-3.375$, *P*=0.001)。

2.1.2 患者 NAs 治疗后发生 LLV 的多因素 Logistic 回归分析:见表 2。66 例 LLV 患者(34 例持续性 LLV 患者及 32 例间歇性 LLV 患者)与 49 例 SVR 患者以是否发生 LLV 作因变量,HBcAg 阳性率、HBsAg(IgIU/ml)作为自变量进行 Logistic 回归分析发现,患者治疗前 HBcAg 阳性(OR:8.660, 95%CI: 2.865 ~ 26.183)是患者 NAs 治疗后发生 LLV 的独立危险因素。

表 1 患者 NAs 治疗后发生 LLV 的单因素分析 [$\bar{x} \pm s$, *n*(%), M(P₂₅, P₇₅)]

项目	持续性 LLV 组 (<i>n</i> =34)	间歇性 LLV 组 (<i>n</i> =32)	SVR 组 (<i>n</i> =49)	$\chi^2/F/Z$ 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	48.85 \pm 10.61	48.63 \pm 10.26	49.14 \pm 9.29	0.027	0.973
男性 [<i>n</i> (%)]	19(55.88)	17(53.13)	37(75.51)	5.386	0.068
HBcAg 阳性 [<i>n</i> (%)]	24(70.59)	17(53.13)	5(10.20)	33.678	<0.001
HBsAg(IgIU/ml)	3.27(3.03,3.61)	3.04(2.93,3.26)	2.99 (2.20,3.16)	12.314	0.002
HBcAb(S/CO)	94.35(22.40,130.97)	112.42(69.36,129.80)	95.03(51.13,136.73)	0.275	0.872
ALT(U/L)	26.90(17.70,61.00)	25.20(18.95,84.50)	27.90(19.75,50.60)	0.406	0.816
AST(U/L)	34.35(25.80,50.00)	29.05(23.50,50.25)	28.45(21.85,48.50)	1.308	0.520
TBil(μ mol/L)	14.50(12.20,20.20)	13.65(12.55,21.25)	17.10(13.45,21.45)	2.442	0.295
GGT(U/L)	21.70(18.70,36.80)	20.10(14.10,39.25)	23.95(17.00,38.10)	1.064	0.587
Alb(g/L)	42.45(40.40,44.40)	42.50(39.75,44.45)	42.35(40.20,44.10)	0.030	0.985
TBA(μ mol/L)	3.40(2.00,6.70)	2.85(2.00,7.50)	2.80(1.85,4.70)	1.344	0.511
PLT($10^9/L$)	190.79 \pm 74.45	216.42 \pm 55.71	189.97 \pm 61.75	1.151	0.323

表 2 患者 NAs 治疗后发生 LLV 的多因素 Logistic 回归分析

类别	β	SE	Wald	<i>P</i>	OR	95%CI
HBcAg 阳性 [<i>n</i> (%)]	2.159	0.564	14.626	<0.001	8.660	2.865 ~ 26.183
HBsAg(IgIU/ml)	0.805	0.435	3.425	0.064	2.236	0.954 ~ 5.245

2.2 患者发生 LLV 与 NAs 治疗后肝功能、HBV rcDNA, HBV pgRNA 的相关性

2.2.1 患者 NAs 治疗后肝功能指标比较:见表 3。

持续性 LLV 组、间歇性 LLV 组及 SVR 组患者在 NAs 治疗后的肝功能指标比较发现,三组之间的差异无统计学意义($Z=1.405, 0.297, 0.996, 1.471, 0.172$,

0.979, 均 $P>0.05$)。

2.2.2 患者 NAs 治疗后 HBV rcDNA 检测结果比较

115 例患者中 HBV rcDNA 阳性共 22 例, 其中持续性 LLV 组 20 例, 间歇性 LLV 组 2 例, SVR 组 0 例, 三组间 HBV rcDNA 阳性率分别为 58.82%,

6.25%, 0.00%, 差异有统计学意义 ($\chi^2=49.649$, $P<0.001$), 组间进一步两两比较发现, 持续性 LLV 组 HBV rcDNA 阳性率高于 SVR 组和间歇性 LLV 组, 差异均有统计学意义 ($\chi^2=20.504$, 37.974, 均 $P<0.001$)。

表3 患者 NAs 治疗后肝功能指标比较 [M(P₂₅,P₇₅)]

项目	持续性 LLV 组 (n=34)	间歇性 LLV 组 (n=32)	SVR 组 (n=49)	Z 值	P 值
ALT(U/L)	16.70(13.50,25.50)	21.25(13.20,26.50)	22.60(13.80,26.90)	1.405	0.495
AST(U/L)	23.85(19.00,29.00)	22.60(20.20,30.40)	22.90(19.20,29.00)	0.297	0.862
TBil(μ mol/L)	15.50(10.80,19.60)	13.50(11.25,18.00)	15.30(12.40,19.80)	0.996	0.608
GGT(U/L)	19.15(14.30,22.50)	19.80(13.95,26.25)	21.40(15.30,29.40)	1.471	0.479
Alb(g/L)	44.20(43.20,45.70)	44.80(42.40,45.55)	44.50(43.30,46.10)	0.172	0.918
TBA(μ mol/L)	2.55(1.70,4.10)	2.60(1.90,4.55)	3.20(2.10,4.80)	0.979	0.613

2.2.3 患者 NAs 治疗后 HBV pgRNA 检测结果比较
115 例患者中 HBV pgRNA 阳性共 26 例, 其中持续性 LLV 组 18 例, 间歇性 LLV 组 6 例, SVR 组 2 例, 三组间 HBV pgRNA 阳性率分别为 52.94%, 18.75% 和 4.08%, 差异有统计学意义 ($\chi^2=27.763$, $P<0.001$); 三组间 HBV pgRNA (lg copies/ml) 定量结果分别为 5.56 ± 1.02 , 4.29 ± 0.84 和 3.42 ± 0.34 , 差异有统计学意义 ($F=7.211$, $P=0.004$); 组间进一步两两比较发现, 持续性 LLV 组 HBV pgRNA 阳性率高于间歇性 LLV 组和 SVR 组, 差异有统计学意义 ($\chi^2=8.328$, 26.199; $P=0.005$, <0.001); 持续性 LLV 组 HBV pgRNA 定量结果高于间歇性 LLV 组和 SVR 组, 差异有统计学意义 ($t=2.728$, 3.080, $P=0.013$, 0.007)。

3 讨论

随着 HBV DNA 检测试剂灵敏度的提高, 约有 20% ~ 30% 长期接受 NAs 治疗的患者血清中存在低水平的 HBV DNA, 国内外专家将这种情况定义为低病毒血症 (LLV) [5-6]。目前, LLV 的定义国内外尚无相关标准, 鲁凤民等 [7] 专家建议将 CHB 患者接受恩替卡韦、富马酸替诺福韦酯或富马酸丙酚替诺福韦等一线药物治疗至少 48 周以上, 血清 HBV DNA 采用高灵敏 TaqMan 实时荧光定量法 (real-time quantitative PCR detecting system, qPCR) 仍可检测到, 但 $<2\ 000$ IU/ml, 在排除依从性问题及病毒耐药突变后, 定义为 LLV; LLV 可以分为两类: 持续性 LLV 和间歇性 LLV。CHB 患者接受 NAs 药物治疗后发生 LLV 成为目前 HBV 抗病毒治疗的难点和热点。本研究根据 LLV 的定义及分类对纳入研究的 115 例患者分为持续性 LLV 组、间歇性 LLV 组和 SVR 组, 并对患者 NAs 治疗前临床特征及实验室指标比较发现, 持续性 LLV 组及间

歇性 LLV 组 HBeAg 阳性率明显高于 SVR 组, 持续性 LLV 组 HBsAg(IgIU/ml) 结果明显高于 SVR 组, 与程齐齐等 [8] 的研究结果一致。多因素 Logistic 回归分析发现, 患者 NAs 治疗前 HBeAg 阳性是 LLV 发生的独立危险因素。

HBV 病毒颗粒进入肝细胞, 病毒颗粒内的 rcDNA 被释放到细胞核中并形成 cccDNA; 病毒 pgRNA 从 cccDNA 转录并翻译成病毒蛋白, 在细胞质中, 病毒聚合酶与 pgRNA 结合并被核心蛋白包裹; 在核衣壳内, pgRNA 经逆转录酶和病毒聚合酶形成 rcDNA; 成熟衣壳被包裹并通过多囊泡体 (multivesicular body, MVB) 分泌途径作为子代病毒颗粒分泌, 完成 HBV 的复制周期 [4,9]。NAs 是一种直接口服抗病毒药物, 通过竞争性抑制病毒聚合酶和逆转录酶来抑制 pgRNA 逆转录为 rcDNA, 从而形成无感染能力的基因组缺陷子代病毒颗粒 [10-11]。王雷婕等 [12-13] 认为 CHB 患者接受 NAs 抗病毒治疗后发生 LLV 的可能机制为患者较弱的免疫应答状态和 NAs 竞争性抑制病毒复制所特有的局限性。

近年来研究发现 [12], ALT 水平能够反映机体自身免疫应答状态, NAs 治疗后 ALT 水平可能与 LLV 的发生有关; ALT 水平低, 机体免疫应答较弱, 不利于感染 HBV 的肝细胞清除和 cccDNA 的丢失, 因此, ALT 水平低的患者可能易发生 LLV。然而, 也有研究发现 ALT 水平与 LLV 的发生无相关性 [14]。本研究发现, NAs 治疗后 ALT, AST 等肝功能指标在持续性 LLV 组、间歇性 LLV 组以及 SVR 组间差异无统计学意义。

NAs 竞争性抑制病毒复制所特有的一种局限性为患者细胞内大量 dNTP 存在的情况下, NAs 无法完全阻断 HBV pgRNA 逆转录 rcDNA 的合成,

未被阻断的含 rcDNA 的病毒颗粒分泌入血液可继续感染患者肝细胞完成 HBV 的复制周期^[12]。本研究对持续性 LLV 组、间歇性 LLV 组和 SVR 组患者进行 HBV rcDNA 检测发现, 持续性 LLV 组 rcDNA 阳性率明显高于间歇性 LLV 组和 SVR 组。持续性 LLV 组患者血液中含 rcDNA 的病毒颗粒导致血清中 HBV DNA 采用高灵敏 qPCR 法仍可检测到, 从而导致患者 NAs 治疗后发生 LLV。血液中含 rcDNA 的病毒颗粒可继续感染患者肝细胞完成 HBV 的复制周期, 导致 LLV 患者纤维化进展及肝癌发生^[15-16]。

NAs 竞争性抑制病毒复制所特有的另一种局限性为 NAs 竞争性抑制 HBV pgRNA 逆转录为 rcDNA, 但对共价闭合环状 DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA) 的影响较小, cccDNA 的长期存在是 HBV 慢性感染的重要原因^[17-18]。理论上, cccDNA 水平应该是预测预后的最直接指标; 然而, 由于其分布不均和侵入性检查造成的损伤, cccDNA 的应用受到限制^[19]。研究发现, pgRNA 是 cccDNA 的直接转录产物, pgRNA 与 cccDNA 呈正相关且反映 cccDNA 的转录活性^[20-22]。本研究对持续性 LLV 组、间歇性 LLV 组及 SVR 组患者进行 pgRNA 检测发现, 持续性 LLV 组 pgRNA 阳性率明显高于间歇性 LLV 组和 SVR 组, 持续性 LLV 组 pgRNA 定量结果明显高于间歇性 LLV 组和 SVR 组。因此, 持续性 LLV 患者 pgRNA 阳性率高及定量水平高, 反映 cccDNA 的转录活性强, rcDNA 维持在较高的合成水平, NAs 无法完成抑制 rcDNA 的合成, rcDNA 可被成熟衣壳包裹并通过 MVB 分泌途径作为子代病毒颗粒分泌入血液中, 导致血清中 HBV DNA 采用高灵敏 qPCR 法仍可检测到, 从而导致患者 NAs 治疗后发生 LLV。

综上所述, 治疗前 HBeAg 阳性是 CHB 患者 NAs 治疗后发生 LLV 的独立危险因素; CHB 患者 NAs 治疗后部分 LLV 患者 (特别是持续性 LLV 患者) pgRNA 阳性且定量水平高, cccDNA 转录活性强, rcDNA 维持在较高的合成水平, NAs 无法完成抑制 rcDNA 的合成, rcDNA 可被成熟衣壳包裹并通过 MVB 分泌途径作为子代病毒颗粒分泌入血液中, 导致血清中 HBV DNA 采用高灵敏 qPCR 法仍可检测到, 从而导致患者 NAs 治疗后发生 LLV, 由于血液中的 rcDNA 的存在, HBV 可继续感染肝细胞完成 HBV 的复制周期, 从而导致发生 LLV 患者纤维化进展及肝癌发生。本研究存在以下几点不足之处: ①因部分患者 NAs 治疗前 HBV DNA 定量结果缺失, 未进行基线 HBV DNA 水平对 48 周后 NAs 治疗效果的影响评估; ②未考虑药物与药物、药物与食物

的相互作用对一线 NAs 抗病毒作用的可能影响; ③样本量相对较少, 研究结果可能存在偏倚。因此, CHB 患者接受 NAs 治疗后发生低病毒血症的危险因素及机制还需要大样本和多中心的进一步研究。

参考文献:

- [1] ZHANG Qian, PENG Hong, LIU Xiaoqiang, et al. Chronic hepatitis B infection with low level viremia correlates with the progression of the liver disease[J]. Journal Clinical Translational Hepatology, 2021, 9(6): 850-859.
- [2] SUN Yameng, WU Xiaoning, ZHOU Jialing, et al. Persistent low level of hepatitis B virus promotes fibrosis progression during therapy[J]. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2020, 18(11): 2582-2591.
- [3] LI Zhongbin, LI Le, NIU Xiaoxia, et al. Switching from entecavir to tenofovir alafenamide for chronic hepatitis B patients with low-level viraemia[J]. Liver International, 2021, 41(6): 1254-1264.
- [4] LIU Yongzhen, LIU Hui, HU Zhanying, et al. Hepatitis B virus virions produced under nucleos(t)ide analogue treatment are mainly not infectious because of irreversible DNA chain termination[J]. Hepatology, 2020, 71(2): 463-476.
- [5] 刘丽华, 叶贤林, 程丽娜, 等. 广东省河源地区献血人群隐匿性乙型肝炎病毒感染的血清学及分子生物学特征分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(4): 32-36, 74.
LIU Lihua, YE Xianlin, CHENG Lina, et al. Analysis of serological and molecular characterization of occult hepatitis B virus infection among blood donors in Heyuan, Guangdong[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(4): 32-36, 74.
- [6] OGAWA E, NOMURA H, NAKAMUTA M, et al. Tenofovir alafenamide after switching from entecavir or nucleos(t)ide combination therapy for patients with chronic hepatitis B[J]. Liver International, 2020, 40(7): 1578-1589.
- [7] 鲁凤民, 封波, 郑素军, 等. 核苷 (酸) 类似物经治的慢性乙型肝炎患者低病毒血症的研究现状 [J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(6): 1268-1274.
LU Fengmin, FENG Bo, ZHENG Sujun, et al. Current status of the research on low-level viremia in chronic hepatitis B patients receiving nucleos(t)ide analogues[J]. Journal of Clinical Hepatology, 2021, 37(6): 1268-1274.
- [8] 程齐齐, 杨丽霞, 蔡天盼, 等. 核苷 (酸) 类似物初治的慢性乙型肝炎患者发生低病毒血症的影响因素及其动态变化分析 [J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(12): 2716-2722.
CHENG Qiqi, YANG Lixia, CAI Tianpan, et al. Influencing factors for low-level viremia and their dynamic changes in patients with chronic hepatitis B treated with nucleos(t)ide analogues for the first time[J]. Journal of Clinical Hepatology, 2022, 38(12): 2716-2722.

(下转第 184 页)

- Study of the expression of the serum sTRAIL, and its correlation with levels of serum IL-6 and hepcidin in the patients with the tumor and hematological diseases[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2021, 36(1): 58-60, 64.
- [17] ZHU Lei, YIN Hong, QIAN Tong, et al. Distinct expression and clinical value of aquaporin 4 in children with hand, foot and mouth disease caused by enterovirus 71[J]. *Journal of Medical Virology*, 2022, 94(2): 587-593.
- [18] LEE J Y, SON M, KANG Jinhan, et al. Serum interleukin-6 levels as an indicator of aseptic meningitis among children with enterovirus 71-induced hand, foot and mouth disease[J]. *Postgraduate Medicine*, 2018, 130(2): 258-263.
- [19] TAVENIER J, RASMUSSEN L J H, ANDERSEN A L, et al. Association of GDF15 with inflammation and physical function during aging and recovery after acute hospitalization: a longitudinal study of older patients and Age-Matched controls[J]. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 2021, 76(6): 964-974.
- [20] YANG Pinni, ZHU Zhengbao, SHI Mengyao, et al. Association of serum growth differentiation factor-15 levels with the risks of death and vascular events in patients with ischemic stroke: The role of diabetes[J]. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2022, 32(3): 616-623.
- [21] WANG Bei, ZHANG Chongyang, YU Congci, et al. Enterovirus 71 induces INF2 cleavage via activated caspase-2 in infected RD cells [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 684953.
- 收稿日期: 2022-09-13
修回日期: 2023-05-15
-
- (上接第 137 页)
- [9] TAO Yachao, WANG Menglan, LIAO Juan, et al. Dynamics of serum pregenome RNA in chronic hepatitis B patients receiving 96-month nucleos(t)ide analog therapy[J]. *Frontiers in Medicine*, 2022, 9: 787770.
- [10] MARCHETTI A L, GUO H. New insights on molecular mechanism of hepatitis B virus covalently closed circular DNA formation[J]. *Cells*, 2020, 9(11): 2430.
- [11] XIE Yiran, ZHU Haoxiang, GUO Yifei, et al. Reduction of hepatitis B surface antigen may be more significant in PEGylated interferon-alpha therapy combined with nucleotide analogues than combined with nucleoside analogues in chronic hepatitis B patients: a propensity score matching study[J]. *Canadian Journal of Gastroenterology Hepatology*, 2022, 2022: 4325352.
- [12] 王雷婕, 顾智强, 许梓萌, 等. 核苷(酸)类药物经治慢性乙型肝炎患者低病毒血症发生的可能机制[J]. *中华肝脏病杂志*, 2021, 29(12): 1151-1155.
- WANG Leijie, GU Zhiqiang, XU Zimeng, et al. A possible mechanism for low-level viremia occurrence in nucleos(t)ide analog-treated chronic hepatitis B patients[J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2021, 29(12): 1151-1155.
- [13] HIGASHI-KUWATA N, HAYASHI S, KUMAMOTO H, et al. Identification of a novel long-acting 4'-modified nucleoside reverse transcriptase inhibitor against HBV[J]. *Journal of Hepatology*, 2021, 74(5): 1075-1086.
- [14] 宣碧碧, 徐永红, 杜忠彩, 等. 慢性乙型肝炎和乙型肝炎肝硬化患者发生低病毒血症的影响因素及其与肝脏炎症、肝纤维化进展的关系[J]. *临床肝胆病杂志*, 2022, 38(10): 2252-2259.
- XUAN Bibi, XU Yonghong, DU Zhongcai, et al. Influencing factors for low-level viremia in patients with chronic hepatitis B or hepatitis B liver cirrhosis and its association with the progression of liver inflammation and liver fibrosis[J]. *Journal of Clinical Hepatology*, 2022, 38(10): 2252-2259.
- [15] SATO K, INOUE J, AKAHANE T, et al. Switching to tenofovir alafenamide fumarate in chronic hepatitis B patients who had detectable HBV DNA during treatment with entecavir[J]. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2022, 258(4): 277-285.
- [16] HUANG Zehong, LU Guiyang, QIU Lingxian, et al. Risk of hepatocellular carcinoma in antiviral treatment-naïve chronic hepatitis B patients treated with entecavir or tenofovir disoproxil fumarate: a network meta-analysis[J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1): 287.
- [17] JIANG Bei, DAI Qinghai, LIU Yamin, et al. Levels of HBV RNA in chronic HBV infected patients during first-line nucleos(t)ide analogues therapy[J]. *Infectious Agents and Cancer*, 2022, 17(1): 61.
- [18] 张媛媛. 血清 HBV pgRNA 的特征及临床价值[J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(4): 1018-1022.
- ZHANG Yuanyuan. Characteristics and clinical value of serum HBV pgRNA [J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(4): 1018-1022.
- [19] YAN Haozhen, HUANG Zhihao, GUO Xuguang, et al. A study on pregenomic RNA and factors related to hepatitis B virus infection based on real world[J]. *Frontiers in Public Health*, 2022, 10: 856103.
- [20] PAN Jiali, TIAN Yu, XU Jinghang, et al. Dynamics of hepatitis B virus pregenomic RNA in chronic hepatitis B patients with antiviral therapy over 9 years[J]. *Frontiers in Medicine*, 2022, 9: 851717.
- [21] 李小鹏, 李雷, 袁松松, 等. 高灵敏乙型肝炎病毒 DNA 阴性慢性乙型肝炎患者 70 例血清乙型肝炎病毒前基因组 RNA 水平的分析[J]. *中华传染病杂志*, 2021, 39(9): 558-561.
- LI Xiaopeng, LI Lei, YUAN Songsong, et al. Analysis of serum HBV pregenomic RNA levels in 70 patients with highly sensitive HBV DNA negative chronic hepatitis B[J]. *Chinese Journal of Infectious Diseases*, 2021, 39(9): 558-561.
- [22] XIA Muye, CHI Heng, WU Yaobo, et al. Serum hepatitis B virus RNA level is associated with biochemical relapse in patients with chronic hepatitis B infection who discontinue nucleos(t)ide analogue treatment[J]. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2021, 54(5): 709-714.
- 收稿日期: 2023-03-24
修回日期: 2023-06-14