

## 文献综述

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002936

## HBV血清学标志物研究进展

刘俊叶<sup>1</sup>,周 华<sup>2</sup>,伍晓莉<sup>1</sup>,汪德强<sup>1</sup>

(1.重庆医科大学检验医学院,重庆 400016;2.重庆医科大学附属第二医院检验科,重庆 400010)

**【摘要】**疫苗的接种、人类卫生意识的提高、抗病毒药物的逐渐开发降低了乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)的感染,但HBV的消除仍是一大难题,因此HBV的精准检出率极为重要。传统的血清标志物HBV DNA和乙肝表面抗原(hepatitis B surface antigen,HBsAg)在准确反映共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA,cccDNA)转录活性与用药检测方面存在一定的局限性。为此,研究者陆续开发出新型HBV血清标志物,如HBV表面抗原、HBV RNA、HBV核心相关抗原、HBV大表面蛋白。基于不同标志物在疾病诊断中的不同参考价值,本文简要对这些标志物的临床应用及面临挑战进行小结,旨在为HBV的高效、准确检出及临床预后提供参考。

**【关键词】**乙型肝炎病毒;血清学标志物**【中图分类号】**R446.11**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2021-04-02

## Research progress of HBV serological markers

Liu Junye<sup>1</sup>, Zhou Hua<sup>2</sup>, Wu Xiaoli<sup>1</sup>, Wang Deqiang<sup>1</sup>

(1. College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University; 2. Department of Laboratory Medicine, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

**【Abstract】**Even though the infection of hepatitis B virus(HBV) has been reduced by the vaccination and the improvement of human health awareness, and the gradual development of antiviral drugs. So far, the elimination of HBV is still a serious problem. Hence, the accurate detection rate of HBV is extremely important. The traditional serum makers HBV DNA and hepatitis B surface antigen (HBsAg) have certain limitations in assessing the anti-HBV efficacy and accurately reflecting the transcriptional activity of covalently closed circular DNA(cccDNA). In order to solve this situation, novel HBV serum markers have been developed, such as HBV surface antigen, HBV RNA, HBV core related antigen, and HBV large surface protein. Based on the different reference values of different markers in disease diagnosis, this article briefly summarizes the clinical applications and limitations of these markers, which aims to provide references for the efficient and accurate detection of HBV and clinical prognosis.

**【Key words】**hepatitis B virus; serum marker

乙型肝炎病毒的难以治愈性源于共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA,cccDNA)主要分布于肝细胞核中,药物无法将其彻底清除。乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)的精准检测为肝组织活检,但存在创伤性大、成本高等

**作者简介:**刘俊叶,Email:1278472456@qq.com,

研究方向:乙型肝炎病毒治疗药物研究、HBV检测方法研究。

**通信作者:**汪德强,Email:wangdq@cqmu.edu.cn。

**基金项目:**重庆市自然科学基金重点资助项目(编号:CQYC202003036);

国家传染病重大专项任务级子课题资助项目(编号:2013ZX10002002-003-002)。

**优先出版:**<https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20211206.1516.012.html>

(2021-12-07)

问题。针对这一现状,研究者逐渐发现非侵入性的检测方法,即通过寻找合适的血清学标志物来反映肝细胞内cccDNA的活性。传统的血清标志物如HBV DNA和乙肝表面抗原(hepatitis B surface antigen,HBsAg)在评估抗HBV疗效和准确反映cccDNA转录活性方面存在一定局限性。许多患者用药后虽然血清中无法检测到HBV DNA拷贝数,但其发展为肝细胞疾病的风险仍较高。因此,除了HBV DNA及HBsAg检测外,应开发出更多具有代表性的血清标志物,以便更加准确、高效地诊断HBV,并为临床用药、用药后病毒检测提供更好的指导作用。

## 1 HBsAg

HBsAg 即 HBV 的表面抗原,作为 HBV 诊断初筛的认可血清标志物,常被用于 HBV 的定性诊断,是 HBV 感染筛查与实验室诊断的关键指标<sup>[1]</sup>。一般情况下,若 HBsAg 的检测结果为阳性,则大致可以判断该患者患有乙肝。HBsAg 有 2 大来源:一方面源于 HBV cccDNA 的转录翻译,另一方面来自整合基因的分泌。因此,HBsAg 不仅可以反映 cccDNA 的转录活性,还可以在在一定程度上反映机体对 HBV 的免疫情况<sup>[2-3]</sup>。除此之外,HBsAg 被认为对核苷酸类似物(nucleoside analog,NA)停药有一定的指导意义。对低拷贝数的乙型肝炎 e 抗原(hepatitis B e antigen,HBeAg)阴性患者而言,血清 HBsAg 的含量比 HBV DNA 更有监测性。在指导用药方面,NA 停药的标准为 HBV DNA 持续降低,但是越来越多的患者出现停药后反弹现象。针对这一现状,研究者发现若血清中 HBsAg 低于检测下限,那么无论是否存在 anti-HBs 阴转,停药后几乎不出现反弹,因此血清中 HBsAg 的丢失被推荐为理想的治愈终点<sup>[4-6]</sup>,然而现存的抗 HBV 药物难以完全消除 HBsAg。Yao CC 等<sup>[7]</sup>报道,即使 HBsAg 的水平达到治疗终点,有些患者在 5 年随访时仍有 39.4% 的病毒复发率与 27.6% 的临床复发率,因此仍需寻找新的标志物来指导停药。在预测肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)方面,HBsAg 的定量检测在血清 HBsAg 水平与 HBV DNA 呈互补关系,尤其是在 HBV DNA<200 000 IU/mL 的患者中。

总而言之,HBsAg 定量检测可以预测病情进程,指导临床用药,但只能作为 HBV DNA 的互补检测而不能取而代之。

## 2 HBV RNA

早在 1996 年,研究人员发现除了 HBV DNA 外,在感染 HBV 的患者血清中还发现了 HBV RNA<sup>[8]</sup>。但是,关于 HBV RNA 的性质、来源,直到近几十年才有了详细的报道。Jansen L 等<sup>[9]</sup>的实验发现,用乙肝核心抗原(hepatitis B virus core antigen,HBcAg)特异性抗体捕获血清后,其捕获产物中可以检测到 HBV RNA,将 HBV 包膜蛋白溶解后,其 RNA 水平明显上升,由此证实 HBV RNA 被衣壳化与包膜化。Wang J 等<sup>[10]</sup>采用 Northern blot 和互补脱氧核糖核酸(complementary deoxyribonucleic acid,cDNA)末端 5' 快速扩增实验证明血清 HBV RNA 为 HBV 前基因组 RNA(pregenomic RNA,pgRNA),蔗糖密度梯度实验及电镜实验证明 HBV RNA 存在于病毒颗粒中,但是目前尚未发现可以直接将 HBV RNA 病毒颗粒分离出来的方法。

临床应用方面,HBV RNA 被认为可作为有用的生物标志物<sup>[11-12]</sup>。首先,血清 HBV RNA 被发现可以作为 cccDNA 活性的一个合适的替代标记物<sup>[13-14]</sup>,对于 HBeAg 阳性的慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B,CHB)患者,血清 HBV RNA 的水平与 cccDNA 呈正相关,而当 HBeAg 转为阴性后,虽然两者的相关性消失,但是 HBV RNA 仍可定性反映 cccDNA 的转录活性。由此可见,HBV RNA 可以较好地反映血清内 cccDNA 的水平,而与 HBeAg 的状态无关。其次,血清 HBV RNA 在特定程度可以监测 NA 的疗效。Wang J 等<sup>[10]</sup>通过实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR,qRT-PCR)与逆转录 PCR(reverse transcription PCR,RT-PCR)发现 NA 治疗后血清中 HBV DNA 拷贝数下降,而 HBV RNA 却呈上升趋势,并且 HBV RNA 的上升程度大致与 HBV DNA 的下降量一致。理论上 NA 的使用会使部分双链松弛环状 DNA(partially double-stranded relaxed circular DNA,rcDNA)的合成受阻,而对 HBV-RNA 样病毒颗粒的形成无影响,特别是对于接受 NA 治疗的患者,这种现象更明显。因此 HBV RNA 在指导 NA 安全停药方面具有特殊意义。除此之外,HBV RNA 也被认为是接受拉米夫定用药治疗的患者早期 YMDD 突变的预测指标<sup>[15]</sup>。

但是,目前从技术上很难分离出纯净的 HBV RNA 病毒粒子,仅有少许文献报道,NA 治疗下产生的 HBV RNA 类病毒粒子是复制缺陷型的<sup>[16]</sup>。至于 HBV RNA 的衣壳化状态,是否具有感染性,在肝细胞中产生后有无致病性及具体的致病机制等,仍有待研究。

## 3 乙肝病毒核心相关抗原(hepatitis B core related antigen,HBcrAg)

HBcrAg 包含 HBcAg、HBeAg、22 kD 的前核心蛋白(pre-core protein,p22cr),这 3 种蛋白共同分享 149 个相同氨基酸<sup>[17]</sup>。HBcAg 是 HBV 的核心蛋白,主要参与病毒 DNA 组装。HBeAg 是一种分泌蛋白,由核心蛋白基因翻译,经过剪切、修饰后从肝细胞释放,通常被认为是 HBV 活跃复制的血清学标志物<sup>[18]</sup>。P22cr 与 HBeAg 均来自前核心蛋白,是前核心蛋白翻译后修饰的产物之一,与后者相比,其存在未切割的信号肽。在 HBV DNA 阴性的病毒粒子中,p22cr 是主要的前核心/核心蛋白<sup>[19]</sup>。

HBcrAg 被报道在疾病诊断、药物治疗后复发等多方面起关键作用。首先,在 HBV 诊断方面,HBcrAg 可以反映 cccDNA 的活性。因为 HBcrAg 仅来源于 HBV cccDNA,而 HBsAg 一方面来自 cccDNA 的翻译,另一方面源于整合基因的翻译,因此与 HBsAg 相比,HBcrAg 与 HBV DNA 的相关性较好<sup>[20]</sup>,且与 HBeAg 是否阴转无关。Su F 等<sup>[21]</sup>首次报道了

HBcrAg同其他病毒标志物如 HBeAg、HBsAg、血清 HBV DNA 和肝内 cccDNA 等存在良好的相关性。此外,HBcrAg 被证明是 NA 治疗后复发的预测因子<sup>[23]</sup>。在 HCC 预测方面,文献显示对于因接受 NA 治疗而使 HBV DNA 水平低于检测下限的患者而言,HBcrAg 的水平与 HCC 的发生具有相关性<sup>[23]</sup>。

综上所述,血清 HBcrAg 在疾病诊断、停药预后、HCC 监测等多方面起指导作用<sup>[24]</sup>。尽管现阶段关于 HBcrAg 的研究已陆续被报道,但仍存在许多问题有待解决。例如,怎样将血清 HBcrAg、HBsAg 同 HBV RNA 联合使用,更可靠、准确地反映 cccDNA 水平? 如何将 HBcrAg 与其他血清学标志物结合起来更精准地预测 HCC?

#### 4 HBV Lp

乙肝表面大蛋白(large surface protein,LHBs/Lp)是 HBV 病毒粒子的包膜蛋白,共含 389 个氨基酸,主要含乙肝病毒前 S1 抗原(PreS1)、乙肝病毒前 S2 抗原(PreS2)、HBsAg 3 个结构域<sup>[25]</sup>,鉴于 HBV 基因型的不同,PreS1 区域分别含 108、118、119 个氨基酸<sup>[26]</sup>。HBV PreS1 仅存在于 HBV 完整病毒颗粒(complete virus particles,HBV Dane)中<sup>[27]</sup>。HBsAg 存在于所有表面蛋白中,PreS2 存在于 LHBs 与表面蛋白(middle envelope proteins,MHBs)中<sup>[28]</sup>。细胞中 PreS1、PreS2、HBsAg 3 种表面蛋白存在一定的比例性,从而更好地参与病毒颗粒的包装。若 LHBs 的水平明显上升,则会间接抑制 HBsAg 分泌。LHBs 的 PreS1 结构域 N 端肉豆蔻酰化被认为可与肝细胞受体 NTCP 结合<sup>[29]</sup>,从而介导 HBV 进入,因此 PreS1 是 HBV 感染不可缺少的部分。

临床方面,因为 HBV Dane 颗粒被认为是唯一的感染性病毒颗粒<sup>[9]</sup>。因此,临床已陆续将 HBV Lp 作为检测指标。张苏贞等<sup>[30]</sup>通过对 CHB 患者各个疾病阶段的血清进行研究发现,LHB 的检出率可以达到 75%,对于初次发作或药物治疗后病毒处于稳定状态的 CHB 患者而言,血清中 HBV Lp 与 HBV DNA 之间存在良好的相关性。也有报道发现,与 HBV DNA 相比,HBV Lp 有较高的阳性率,加上大表面蛋白还可以反式激活病毒复制,因此对血清中 HBV Lp 水平的检测不仅可以大致判断病毒的传染性还可以评估其复制情况。而 PreS1 蛋白因无法展现 HBV 复制过程中的拓扑结构,因此其阳性水平低于 HBV Lp。其次,LHBs 被认为与 HCC 的发展有关。Li TN 等<sup>[31]</sup>报道 LHBs 一方面会引起丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(polo-like kinase 1,PLK1)上调,另一方面会导致肝细胞 DNA 损伤,最终诱导肝细胞发生非整倍体分裂。细胞质分裂失败和非整倍体可能导致染色体/基因组不稳定<sup>[32]</sup>,产生遗传多样性,从而启动 HCC 的发展。因此,在某种意义上,HBV Lp 也可作为

预测 HCC 的生物标志物。有研究表明,HBV LHBs、MHBs 的定量检测对无活性乙肝病毒携带者的鉴定起着重要的指导意义<sup>[33]</sup>。除此之外,HBV LHBs 也是疫苗研发的重要抗原。

遗憾的是,目前尚未完全解析出 LHBs 的三维结构,该蛋白的关键功能也仍未完全确定。加之 HBV RNA 样病毒粒子也存在 LHBs,因此,HBV Lp 可以大致反映 HBV 的传染状态,却不能代表完整病毒颗粒的真实含量。

综上所述,HBV 的血清学检测、最佳用药时间与停药标准仍然构成巨大挑战。随着医学的发展,越来越多的血清标志物已被鉴定,如 HBV RNA、HBcrAg 等。但是这些生物标志物均存在一定的优势与不足,联合使用或开发新的血清学标志物可能会对 HBV 检测、用药指示及疾病发展提供良好的指导作用,以达到功能性康复为目标、彻底根除 HBV 的目的。

#### 参 考 文 献

- [1] Chevaliez S,Roudot-Thoraval F,Hézode C,et al. Performance of rapid diagnostic tests for hepatitis B surface antigen detection in serum or plasma[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*,2021,100(2):1153-1155.
- [2] Chan HLY,Thompson A,Martinot-Peignoux M,et al. Hepatitis B surface antigen quantification:why and how to use it in 2011;a core group report[J]. *J Hepatol*,2011,55(5):1121-1131.
- [3] Su TH,Hsu CS,Chen CL,et al. Serum hepatitis B surface antigen concentration correlates with HBV DNA level in patients with chronic hepatitis B[J]. *Antivir Ther*,2010,15(8):1133-1139.
- [4] Chen CH,Hsu YC,Lu SN,et al. The incidence and predictors of HBV relapse after cessation of tenofovir therapy in chronic hepatitis B patients[J]. *J Viral Hepat*,2018,25(5):590-597.
- [5] Chen CH,Hung CH,Hu TH,et al. Association between level of hepatitis B surface antigen and relapse after entecavir therapy for chronic hepatitis B virus infection[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*,2015,13(11):1984-1992. e1.
- [6] Chen CH,Hung CH,Wang JH,et al. Long-term incidence and predictors of hepatitis B surface antigen loss after discontinuing nucleoside analogues in noncirrhotic chronic hepatitis B patients[J]. *Clin Microbiol Infect*,2018,24(9):997-1003.
- [7] Yao CC,Hung CH,Hu TH,et al. Incidence and predictors of HBV relapse after cessation of nucleoside analogues in HBeAg-negative patients with HBsAg $\leq$ 200 IU/mL[J]. *Sci Rep*,2017,7(1):1839.
- [8] Kock 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.
- [9] Jansen L,Kootstra NA,van Dort KA,et al. Hepatitis B virus pregenomic RNA is present in virions in plasma and is associated with a response to pegylated interferon Alfa-2a and nucleos(t)ide analogues[J].

- J Infect Dis, 2016, 213(2): 224–232.
- [10] Wang J, Shen T, Huang XB, 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.
- [11] Wang J, Yu YQ, Li GJ, et al. Relationship between serum HBV-RNA levels and intrahepatic viral as well as histologic activity markers in entecavir-treated patients[J]. J Hepatol, 2018, 68(1): 16–24.
- [12] Tsuge M, Murakami E, Imamura M, et al. Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleotide analogue treatments in chronic hepatitis B patients[J]. J Gastroenterol, 2013, 48(10): 1188–1204.
- [13] Wang J, Du M, Huang HX, et al. Reply to: “serum HBV pgRNA as a clinical marker for cccDNA activity”[J]. J Hepatol, 2017, 66(2): 462–463.
- [14] Giersch K, Allweiss L, Volz T, et al. Serum HBV pgRNA as a clinical marker for cccDNA activity[J]. J Hepatol, 2017, 66(2): 460–462.
- [15] 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.
- [16] Wang J, Sheng QJ, Ding Y, et al. HBV RNA virion-like particles produced under nucleos(t) ide analogues treatment are mainly replication-deficient[J]. J Hepatol, 2018, 68(4): 847–849.
- [17] Inoue T, Tanaka Y. Novel biomarkers for the management of chronic hepatitis B[J]. Clin Mol Hepatol, 2020, 26(3): 261–279.
- [18] Dandri M, Locarnini S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection[J]. Gut, 2012, 61(Suppl 1): i6–i17.
- [19] Kimura T, Ohno N, Terada N, et al. Hepatitis B virus DNA-negative Dane particles lack core protein but contain a 22-kDa precore protein without C-terminal arginine-rich domain[J]. J Biol Chem, 2005, 280(23): 21713–21719.
- [20] Yoshida K, Desbiolles A, Feldman SF, et al. Hepatitis B core-related antigen to indicate high viral load: systematic review and Meta-analysis of 10,397 individual participants[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2021, 19(1): 46–60. e8.
- [21] Suzuki F, Miyakoshi H, Kobayashi M, et al. Correlation between serum hepatitis B virus core-related antigen and intrahepatic covalently closed circular DNA in chronic hepatitis B patients[J]. J Med Virol, 2009, 81(1): 27–33.
- [22] Hsu YC, Nguyen MH, Mo LR, et al. Combining hepatitis B core-related and surface antigens at end of nucleos(t)ide analogue treatment to predict off-therapy relapse risk[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2019, 49(1): 107–115.
- [23] Tada T, Kumada T, Toyoda H, et al. HBeAg predicts hepatocellular carcinoma development; an analysis using time-dependent receiver operating characteristics[J]. J Hepatol, 2016, 65(1): 48–56.
- [24] Rokuhara A, Tanaka E, Matsumoto A, et al. Clinical evaluation of a new enzyme immunoassay for hepatitis B virus core-related antigen; a marker distinct from viral DNA for monitoring lamivudine treatment[J]. J Viral Hepat, 2003, 10(4): 324–330.
- [25] Glebe D, Bremer CM. The molecular virology of hepatitis B virus[J]. Semin Liver Dis, 2013, 33(2): 103–112.
- [26] Karatas E, Erensoy S, Akarca US, et al. Analysis of hepatitis B virus (HBV) preS1, preS2 and S gene regions from patient groups infected with HBV genotype D[J]. Mikrobiyol Bul, 2018, 52(1): 23–34.
- [27] Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, et al. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence[J]. J Virol, 1984, 52(2): 396–402.
- [28] Glebe D, Urban S. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(1): 22–38.
- [29] Yan H, Zhong GC, Xu GW, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus[J]. eLife, 2012, 3: e00049.
- [30] 张苏贞, 张杰, 余算, 等. 血清乙肝病病毒大蛋白与乙肝前 S1 抗原联合检测在 HBeAg 阴性乙肝患者诊断中的意义[J]. 中国微生物生态学杂志, 2017, 29(8): 935–938.
- Zhang SZ, Zhang J, Yu S, et al. Significance of combined detection of hepatitis B virus large surface protein and PreS1 antigen in the diagnosis of HBeAg-negative hepatitis B[J]. Chin J Microecol, 2017, 29(8): 935–938.
- [31] Li TN, Wu YJ, Tsai HW, et al. Intrahepatic hepatitis B virus large surface antigen induces hepatocyte hyperploidy via failure of cytokinesis[J]. J Pathol, 2018, 245(4): 502–513.
- [32] Li J, Dallmayer M, Kirchner T, et al. PRC1: linking cytokinesis, chromosomal instability, and cancer evolution[J]. Trends Cancer, 2018, 4(1): 59–73.
- [33] Pfefferkorn M, Böhm S, Schott T, et al. Quantification of large and middle proteins of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) as a novel tool for the identification of inactive HBV carriers[J]. Gut, 2018, 67(11): 2045–2053.

(责任编辑:冉明会)