

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.04.035

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.04.035>

血清 HBV pgRNA 的特征及临床价值

张媛媛 综述 王莉娟, 徐云芳 审校

(淮安市第四人民医院肝病研究所, 江苏 淮安 223002)

[摘要] 目前针对慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染的主要治疗手段是抗病毒治疗, 但很难达到完全治愈, 效果都不尽如人意。前基因组RNA(pregenomic RNA, pgRNA)是慢性HBV感染的新血清学标志物, 是病毒蛋白和病毒DNA合成的模板, 也是HBV cccDNA的直接转录产物。但最近已有研究发现了血清pgRNA的其他新功能。

[关键词] 慢性; 乙型肝炎; 血清学标志物; pgRNA

Characteristics and clinical value of serum HBV pgRNA

ZHANG Yuanyuan, WANG Lijuan, XU Yunfang

(Institute of Liver Disease Research, Huai'an No. 4 People's Hospital, Huai'an Jiangsu 223002, China)

Abstract At present, the main treatment for chronic hepatitis B virus (HBV) infection is antiviral therapy, but it is difficult to achieve complete cure, and the effect is not satisfactory. Pregenomic RNA (pgRNA) is an emerging serological marker for chronic HBV infection. While pgRNA is principally the template for viral proteins and viral DNAs, additional novel functions for the serum pgRNA have recently been described.

Keywords chronic; hepatitis B; serological marker; pregenomic RNA

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)属于嗜肝DNA病毒科, 是一种小的DNA包膜病毒, 可导致严重的肝病, 包括急性和慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)。慢性HBV感染是一个全球性的健康问题, 尤其在亚太地区。在全球范围内, 约2.5亿人患有慢性HBV感染, 每年导致近100万人死亡^[1]。有研究^[2]提出乙型肝炎治愈的3个阶段: 部分治愈(partial cure), 功能性治愈(functional cure)和完全治愈(complete sterilizing cure)。乙型肝炎的部分治愈是指经一段时间的治

疗后, HBV DNA持续低于检测下线, HBsAg仍能检测到; 功能性治愈是指检测不到HBV DNA和HBsAg伴有或不伴血清学转换; 乙型肝炎的完全治愈是指感染细胞中的HBV DNA被彻底清除, 血清中HBsAg完全消失。

虽然现代疗法如核苷类似物(nucleotide analogs, NAs)或聚乙二醇干扰素 α (PEG-IFN α)能有效地阻止HBV的反转录以及病毒复制过程, 但由于它们对共价闭合环状DNA的影响很小, 这些药物很少能完全消除慢性HBV感染, 目前的治疗

收稿日期 (Date of reception): 2019-06-28

通信作者 (Corresponding author): 徐云芳, Email: fyx-1027@163.com

基金项目 (Foundation item): 淮安市科技计划项目 (HAS201614)。This work was supported by Huai'an Science and Technology fund Project, China (HAS201614).

水平几乎不能达到完全治愈^[3-6]。共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)的持续存在是导致HBV感染慢性化, 以及慢性HBV久治不愈的重要原因, 肝细胞内检测不到cccDNA活性被认为是评估HBV感染彻底治愈的重要指标^[7]。血清前基因组RNA(pregenomic RNA, pgRNA)能反映肝内HBV cccDNA的转录活性, 血清HBV RNA的持续丧失可以暗示cccDNA的消除或转录沉默^[8-9]。因此血清pgRNA作为一种新型标志物在监测慢性HBV的治疗过程具有重要的临床意义。

1 HBV 的入侵与 HBV pgRNA 的包装

在侵染过程中, HBV颗粒通过牛磺胆酸钠协同转运多肽(sodium taurocholate cotransporting

polypeptide, NTCP)或硫酸乙酰肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)受体进入肝细胞, 核衣壳被运至细胞核^[10]。松弛环状DNA(relaxed circular DNA, rcDNA)被修复成cccDNA。cccDNA通过宿主细胞RNA聚合酶II转录成不同功能的HBV RNA, 包括能翻译出HBcAg和HBV聚合酶的3.5 kb pgRNA^[11]。随后, HBV聚合酶(pol)与HBV pgRNA的5'端 ϵ 茎环结构相结合形成新的核衣壳, 其中pgRNA首先转化为单链(ss)DNA, 然后转化为rcDNA, 含rcDNA的成熟核衣壳可以获得一个包膜, 并作为感染性病毒粒子从细胞中分泌出来, 或将rcDNA再次送入细胞核以扩增cccDNA库(图1)^[12-14]。因此, pol- ϵ 间的相互作用不仅能启动衣壳化进程, 而且有助于pgRNA的反转录过程。

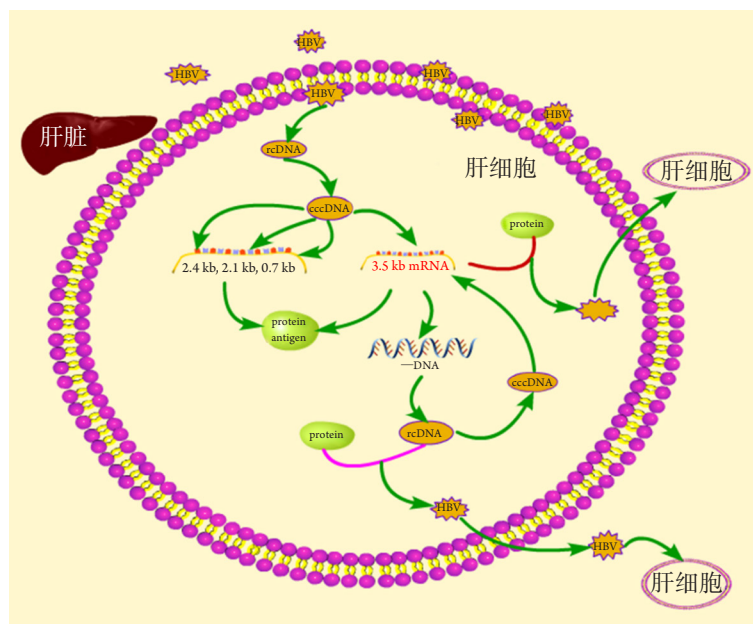


图1 乙型肝炎病毒(HBV)感染细胞过程, 以及前基因组RNA(pgRNA)颗粒产生和pgRNA病毒粒子分泌

Figure 1 Hepatitis B virus (HBV)-infected cells, pre-genomic RNA (pgRNA) particle production and pgRNA virion secretion process

HBV pgRNA包装需要通过病毒聚合酶(Pol)与pgRNA的5'末端区域(TR)上的 ϵ 茎环(ϵ)结合。HBV pgRNA包装受到肝脏特异性和细胞中普遍存在的转录因子的影响。Hsp90复合物包括90 kD热休克蛋白(Hsp90)和几种辅助伴侣, 如Hsp70, Hsp40, Hop/p60和p23, 被发现是形成pol- ϵ 复合物和pgRNA组装所必需的^[15]。RNA结合基序蛋白24(RBM24)富含丙氨酸的结构域(alanine-rich domain, ARD)和pol的反转录酶结构域(reverse

transcriptase, RT), 对于RBM24和Pol之间的结合是必需的。RNA结合基序蛋白24(RNA-binding motif protein 24, RBM24)通过形成pol-RBM24- ϵ 复合物介导pgRNA的包装过程。研究^[16]表明: RBM24的过表达能促进pgRNA的包装, 敲低RBM24则抑制pgRNA的包装。总之, RBM24介导pol- ϵ 相互作用和pol-RBM24- ϵ 复合物的形成, 抑制pgRNA的翻译并促进pgRNA包装成衣壳/病毒粒子用于反转录和DNA合成。La蛋白是一种多功能RNA结合蛋白

(RNA-binding protein, RBP), 通过与HBV RNA内的顺式作用元件相互作用来稳定HBV RNA^[17]。类泛素化修饰NEDDylation可阻止HBx通过泛素化途径降解, 促进cccDNA的转录激活, 刺激pgRNA的包装过程^[18]。核衣壳内的pgRNA也可以被包裹并从肝细胞中释放出来以产生pgRNA病毒粒子(图1), 这是能在血清中检测到HBV pgRNA的重要原因。有研究^[19]表明: 血清中的HBV pgRNA存在于失去反转录活性的病毒颗粒中, 且形成速度很快。因此, 研究产生HBV pgRNA病毒颗粒的分子机制、分析血清定量HBV pgRNA在临床诊断中的潜在作用显得尤其重要。

2 HBV pgRNA 在肝脏疾病中的特征

HBV pgRNA不仅可以作为蛋白合成和病毒DNA复制的模版, 同时也在机体的发病机制中表现出重要的生物学功能。宿主细胞在受到HBV感染的理想免疫反应是: 遭受病毒感染时, 宿主细胞会迅速启动先天性免疫反应, 释放细胞因子干扰素, 通过JAK/STAT信号通路释放细胞因子视黄酸诱导基因-1(retinoic acid-inducible gene-1, RIG-I), RIG-I在识别入侵的病毒中起重要作用。RIG-I与HBV pgRNA的ε茎环结构相结合, 促进IFN-I的释放, 最终抑制病毒的复制过程(图2)^[20-21]。由于HBV的复制是在宿主细胞质的核衣壳内进行, 同时产生的病毒RNA与宿主mRNA相似, 因此HBV感染肝时几乎不会出现先天性的免疫反应^[22]。

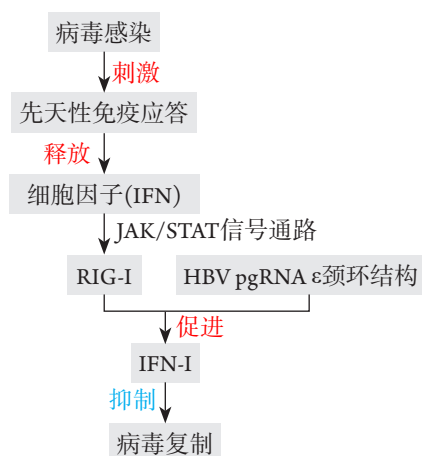


图2 病毒感染的先天性免疫应答过程

Figure 2 Innate immune response process of viral infection

研究^[23-25]表明: HBV pgRNA可以预测慢性HBV患者体内HBeAg血清学转换情况。HBeAg阳性的患者血清pgRNA水平显著高于HBeAg阴性患者, 在HBeAg阳性患者中, 血清HBV pgRNA水平很好地反映cccDNA活性, 但在HBeAg阴性患者中则不能。HBV DNA可以整合到宿主染色体上的不同部位。整合的HBV DNA易发生突变、缺失、插入和重排, 丧失转录成HBV pgRNA的能力, 容易产生不受核苷(酸)类似物(Nucleotide analogues, NAs)治疗影响的HBsAg^[26]。血清HBV RNA与HBV DNA的比值能很好地反映pgRNA的反转录水平, 比值越高, 则pgRNA的反转录水平越低。因此, 血清HBV pgRNA联合HBV DNA水平能更好地反映cccDNA活性^[27]。

HBV pgRNA可作为宿主microRNA的海绵, 使microRNA在宿主中表达失调, 最终导致病理后果^[28]。目前关于这方面的研究已有许多。直接靶向HBV pgRNA并且抑制HBV DNA复制的microRNA(例如miR-138, miR-224, 和miR-576)的转录抑制有助于HBx介导的HBV复制增加^[29]。肝细胞高度特异性microRNA, miR-122在HBV pgRNA序列中具有互补病变作用, 并且在HCC细胞系以及临床样品中观察到其表达量下调。MiR-122负调节肿瘤启动子, miR-122表达的丧失会导致HCC肿瘤的侵袭。此外, miR-122通过调节STAT3磷酸化促进基于IFN的先天免疫反应, 消除STAT3对IFN信号转导的负调节作用^[30]。

血清HBV pgRNA的积累与病毒的持续感染以及病毒学复发有密切关系。Wang等^[31]研究表明: 21例慢性HBV患者在接受抗病毒治疗后pgRNA仍能被检测到, 随访至停药后24周发现, 这21例患者均发生了病毒学复发。除此之外, 血清HBV pgRNA水平与坏死性炎症和纤维化的组织病理学评分相关。血清HBV pgRNA水平对于区分轻度(评分<2)和严重肝组织病理学具有很高的准确性, pgRNA可能存在于HCC细胞中, 引起肿瘤组织中的病毒复制^[32-33]。因此, 来源于非整合的完整HBV DNA的HBV pgRNA可以作为病毒复制和诊断的敏感标志物。

3 pgRNA 与现有的标志物之间的关系

比较和分析近期的研究发现: HBV pgRNA与许多现有的标志物间有很好的相关性。目前普遍

将HBV DNA水平作为量化HBV病毒载量的标准。有研究^[19,24]表明: HBV pgRNA和HBV DNA的血清水平在治疗初期HBV感染者中具有明显的线性关系, 中位相关系数为0.655(0.830~0.470)。Liu等^[34]共招募了291名未接受过治疗的慢性HBV携带者, 根据相关临床数据以及HBV DNA水平, 将患者分为以下四类: 免疫耐受期, HBeAg阳性免疫活性期, 非活动性慢性乙型肝炎和HBeAg阴性免疫反应性肝炎。结果表明: 与HBeAg阳性患者相比, HBeAg阴性患者的血清HBV RNA水平显著降低, 非活动性携带者的血清HBV RNA水平最低; 所有慢性HBV感染患者血清HBV RNA水平与血清HBV DNA和HBsAg水平呈正相关; HBeAg阳性患者血清HBV RNA与HBV DNA或HBsAg之间存在相关性, 在HBeAg阴性患者中, 血清HBV RNA仅与HBV DNA呈正相关。Giersch等^[35]通过人源小鼠的实验发现: 血清pgRNA可作为一种有用的临床替代指标, 用于评估持续存在于HBV感染患者中的cccDNA分子的肝内活性; pgRNA检测也可以帮助监测旨在影响cccDNA转录和/或pgRNA稳定性的peg-IFN α 药物的有效性。

HBV核心相关抗原(HBcrAg)作为一种新的病毒学指标正逐步获得重视。Shimakawa等^[36]收集治疗初期慢性HBV感染患者队列, 评估了血清HBcrAg在诊断HBV DNA水平上的准确性, 结果表明: HBcrAg可能作为HBV DNA定量的准确替代品, 帮助检测低收入和中等收入国家的HBV感染患者。Testoni等^[37]筛选出130例慢性HBV患者, 按HBeAg阴/阳性分组后发现, HBcrAg水平在HBeAg阳性患者中要显著高于HBeAg阴性患者, 这与HBVpgRNA的结果相一致。HBcrAg和HBV RNA的血清水平可能更准确地检测cccDNA水平^[38]。

4 结语

在抗病毒治疗中, 血清HBV DNA的消失并不能真实地反映肝细胞内cccDNA的转录活性, 这是慢性HBV久治不愈和停药后易复发的重要原因。血清HBV pgRNA因其能很好地反映肝内cccDNA的活性而受到广泛关注。血清HBV pgRNA的丧失暗示cccDNA的消除或转录静默, 因此, 血清HBV pgRNA在预测慢性HBV临床治疗效果、反映cccDNA活性指导停药等方面具有重要意义。

然而, 目前还存在着一些问题需要解决。首先, 血清HBV pgRNA来源于非整合的完整HBV基

因组, 对于整合HBV DNA的转录状态的监测作用还有待进一步的研究; 其次, 对于HBeAg阴性患者, 血清HBV pgRNA的检测水平较低, 监测作用难以实现; 最后, 目前针对血清HBV pgRNA的研究队列相对较少, 人群较固定, 多集中于感染HBV的成年人, 对儿童HBV感染者的研究严重缺失。未来需加强人群队列的研究, 增加队列的多样性, 包括筛选不同基因型以及不同年龄段的患者, 以便更好地评估HBV pgRNA在HBV感染患者中的作用, 更加有助于临床诊断和治疗。

参考文献

1. Wu Y, Wen J, Xiao W, et al. Pregenomic RNA: How to assist the management of chronic hepatitis B? [J]. *Rev Med Virol*, 2019, 29(4): e2051.
2. Lok AS, Zoulim F, Dusheiko G, et al. Hepatitis B cure: From discovery to regulatory approval [J]. *Hepatology*, 2017, 66(4): 1296-1313.
3. Agarwal K, Brunetto M, Seto WK, et al. 96 weeks treatment of tenofovir alafenamide vs. tenofovir disoproxil fumarate for hepatitis B virus infection [J]. *J Hepatol*, 2018, 68(4): 672-681.
4. 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.
5. Sarin SK, Kumar M, Lau GK, et al. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update [J]. *Hepatol Int*, 2016, 10(1): 1-98.
6. Terrault NA, Bzowej NH, Chang KM, et al. AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B [J]. *Hepatology*, 2016, 63(1): 261-283.
7. 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): 189-191.
TAN Ning, LUO Hao, XU Xiaoyuan. The significance of HBV pgRNA in the process of chronic hepatitis B [J]. *Journal of Clinical Hepatology*, 2018, 34(10): 189-191.
8. 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.
9. Lam AM, Ren S, Espirita 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.
10. Cornberg M, Wong VW, Locarnini S, et al. The role of quantitative hepatitis B surface antigen revisited [J]. *J Hepatol*, 2017, 66(2): 398-411.

11. 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.
12. Wang GH, Seeger C. The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis[J]. *Cell*, 1992, 71(4): 663-670.
13. Clark DN, Hu J. Hepatitis B virus reverse transcriptase—target of current antiviral therapy and future drug development[J]. *Antiviral Res*, 2015, 123: 132-137.
14. Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection[J]. *Virology*, 2015, 479-480: 672-686.
15. Hu J, Flores D, Toft D, et al. Requirement of heat shock protein 90 for human hepatitis B virus reverse transcriptase function[J]. *J Virol*, 2004, 78(23): 13122-13131.
16. Yao Y, Yang B, Chen Y, et al. RNA-binding motif protein 24 (RBM24) is involved in pregenomic RNA packaging by mediating interaction between hepatitis B virus polymerase and the epsilon element[J]. *J Virol*, 2019, 93(6): e02161-18.
17. Heise T, Guidotti LG, Chisari FV. La autoantigen specifically recognizes a predicted stem-loop in hepatitis B virus RNA[J]. *J Virol*, 1999, 73(7): 5767-5776.
18. Liu N, Zhang J, Yang X, et al. HDM2 promotes NEDDylation of hepatitis B virus HBx to enhance its stability and function[J]. *J Virol*, 2017, 91(16): e00340-17.
19. Prakash K, Rydell GE, Larsson SB, et al. High serum levels of pregenomic RNA reflect frequently failing reverse transcription in hepatitis B virus particles[J]. *J Virol*, 2018, 92(1): 86.
20. Sato S, Li K, Kameyama T, et al. The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus[J]. *Immunity*, 2015, 42(1): 123-132.
21. Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, et al. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(10): 1065-1072.
22. Wieland SF, Chisari FV. Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses[J]. *J Virol*, 2005, 79(15): 9369-9380.
23. van Bömmel 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.
24. 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.
25. Jia W, Zhu MQ, Qi X, et al. Serum hepatitis B virus RNA levels as a predictor of HBeAg seroconversion during treatment with peginterferon alfa-2a[J]. *J Virol*, 2019, 93(1): 61.
26. Yang L, Ye S, Zhao X, et al. Molecular characterization of HBV DNA integration in patients with hepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer*, 2018, 9(18): 3225-3235.
27. Wang J, Yu Y, Li G, et al. Relationship between serum HBV RNA levels and intrahepatic viral as well as histologic activity markers in entecavir-treated patients[J]. *J Hepatol*, 2017, 68(1): 16-24.
28. Takata A, Otsuka M, Ohno M, et al. Mutual antagonism between hepatitis B viral mRNA and host microRNA let-7[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23237.
29. Guerrieri F, Belloni L, D'Andrea D, et al. Genome-wide identification of direct HBx genomic targets[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 184.
30. Xu H, Xu SJ. MicroRNA-122 supports robust innate immunity in hepatocytes by targeting the RTKs/STAT3 signaling pathway[J]. *Elife*, 2019, 8: e41189.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Liu Y, Jiang M, Xue J, et al. Serum HBV RNA quantification: useful for monitoring natural history of chronic hepatitis B infection[J]. *BMC Gastroenterol*, 2019, 19(1): 53.
35. 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.
36. Shimakawa Y, Ndow G, Njie R, et al. Hepatitis B core-related antigen (HBcrAg): an alternative to HBV DNA to assess treatment eligibility in Africa[J]. *Clin Infect Dis*, 2019 [Epub ahead of print].
37. Testoni B, Lebosse F, Scholtes C, et al. Serum hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) correlates with covalently closed circular DNA transcriptional activity in chronic hepatitis B patients[J]. *J Hepatol*, 2019, 70(4): 615-625.
38. Lindh M, Rydell GE, Larsson SB. Impact of integrated viral DNA on the goal to clear hepatitis B surface antigen with different therapeutic strategies[J]. *Curr Opin Virol*, 2018, 30: 24-31.

本文引用: 张媛媛, 王莉娟, 徐云芳. 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. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.04.035

Cite this article as: ZHANG Yuanyuan, WANG Lijuan, XU Yunfang. Characteristics and clinical value of serum HBV pgRNA[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(4): 1018-1022. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.04.035